



Titre: Nanoparticules polymériques pour ciblage des macrophages
Title:

Auteur: Fatiha Chellat
Author:

Date: 2005

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Chellat, F. (2005). Nanoparticules polymériques pour ciblage des macrophages
Citation: [Thèse de doctorat, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.
<https://publications.polymtl.ca/7552/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/7552/>
PolyPublie URL:

**Directeurs de
recherche:**
Advisors:

Programme: Non spécifié
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

NANOPARTICULES POLYMÉRIQUES POUR CIBLAGE DES MACROPHAGES

FATIHA CHELLAT

INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE PHILOSOPHIAE DOCTOR (Ph.D.)

(GÉNIE BIOMÉDICAL)

JUILLET 2005



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-16985-8

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-16985-8

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse intitulée:

NANOPARTICULES POLYMÉRIQUES POUR CIBLAGE DES
MACROPHAGES

Présentée par : CHELLAT Fatiha

En vue de l'obtention du diplôme de Philosophiae Doctor (Ph.D.)

A été dûment acceptée par le jury d'examen constitué de :

M. Savard Pierre, Ph.D., président

M. YAHIA L'Hocine, Ph.D., membre et directeur de recherche

M. YAHYE Merhi, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

M. Moreau Alain, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

M. MATEESCU Mircea-Alexandru, Ph.D., examinateur externe

M. CARTILIER Louis, Ph.D., membre

À mon compagnon de vie terrestre,

À mes deux bouts de choux Celia et Ryan,

Qui éclairent mon existence et illuminent ma vie.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je remercie mon directeur, le Pr. L'Hocine Yahia et mes codirecteurs, les Drs. Yahye Merhi et Alain Moreau pour leur implication, encadrement et conseils judicieux.

Je tiens à remercier les organismes subventionnaires pour la bourse et l'aide financière accordées pour effectuer mes études doctorales. Il s'agit du programme MENTOR (programme des instituts canadiens en santé sur la mobilité et la posture) et la fondation de l'Institut de Cardiologie de Montréal.

Je remercie aussi madame Nathalie Jourdain, coordonnatrice du programme MENTOR pour son excellent travail, son implication auprès des étudiants et son soutien dans certains moments difficiles.

Je remercie aussi le personnel de l'Institut de Cardiologie pour sa disponibilité et son aide dans l'utilisation des appareils, ainsi que les étudiants qui ne sont pas avares de partager leurs connaissances et de prodiguer des conseils. Je remercie particulièrement mesdames Maya Mamarbachi, Nadège Moïse et Marta Ghitescu pour leur aide avec les techniques de biologie moléculaire et assistance pour l'utilisation des appareils.

Je remercie aussi les étudiants et personnel du laboratoire de pathologie expérimentale, plus particulièrement mesdames Danielle Libersan et Nathalie Jacob.

J'aimerais remercier les secrétaires de l'IGB et GRBB, mesdames Diane Giroux, Louise Clément, Julie St-Georges et Ginette Desparois.

Finalement, je remercie les étudiants du GRBB.

RÉSUMÉ

À l'instar des autres secteurs, le milieu biomédical n'échappe pas à l'engouement et l'intérêt suscités par la nanotechnologie. En se basant sur les recherches de ces dernières années, le ciblage des cellules et des tissus, pour le traitement de plusieurs pathologies, figure parmi les perspectives d'avenir les plus prometteuses en la matière. En effet, la vectorisation de substances biologiquement actives au niveau des cellules nécessite le développement de systèmes à l'échelle nanométrique. Ces systèmes nanoparticulaires sont conçus afin de faciliter l'acheminement d'une substance active et son internalisation par la cellule, dans le but d'induire l'effet thérapeutique escompté.

Les nanoparticules à base de polymères polycationiques de charge positive sont parmi les systèmes utilisés pour la complexation d'acides nucléiques (ADN et oligonucléotides). Ces derniers possèdent des charges négatives qui leur permettent d'interagir de façon électrostatique avec les polymères cationiques. Ceci a pour conséquence de compacter l'ADN, de promouvoir son passage à travers la membrane cellulaire et de le protéger de la dégradation dans le milieu biologique. Ce type de nanoparticules possède des applications prometteuses en thérapie génique où l'introduction du matériel génétique vise à induire ou inhiber l'expression d'une protéine donnée pour des usages thérapeutiques.

Le choix des nanovecteurs non-viraux est dicté par les avantages majeurs qui résident dans leur faible toxicité, applicabilité pour la plupart des substances médicamenteuses notamment celles qui sont vulnérables dans les milieux physiologiques, leur faible coût, ainsi que la simplicité et possibilité de production à large échelle.

Dans ce travail nous avons utilisé deux polymères polycationiques : le chitosane (Ch) et le polyéthylèneimine (PEI), pour la complexation d'ADN et d'oligonucléotides (ODN).

Dans un premier temps, le Ch a été utilisé pour la synthèse de nanoparticules avec le plasmide VR1412 contenant un gène codant pour la protéine β -galactosidase (β -gal). L'utilisation du Ch fût dictée par sa biocompatibilité reconnue et par des résultats préalables encourageants (Suh et al., 2000; Corsi et al., 2003).

Il est connu que lors de l'injection des nanoparticules par voie intraveineuse, les macrophages sont les premières cellules qui les interceptent. Cependant, la littérature manquait de données faisant référence aux effets induits par ces nanoparticules suite à leur ingestion par les macrophages, notamment du point de vue inflammatoire.

Notre travail a donc consisté à traiter les macrophages issus d'une lignée humaine (THP-1) avec différentes concentrations de nanoparticules, pendant des périodes de temps variables. La mesure de la sécrétion des cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6 et IL-10) ainsi que des métalloprotéinases (MMP-2 et MMP-9) et leurs inhibiteurs (TIMP-1 et TIMP-2) a été effectuée en dosant leur taux dans les surnageants cellulaires par ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). En plus de cette technique, l'activité gélatinolytique des MMP-2 et MMP-9 a été évaluée par zymographie, étant donné leur implication reconnue dans la dégradation de la matrice extracellulaire. Cette activité a été mesurée dans les surnageants et les lysats cellulaires. Les résultats obtenus ont montré que, même en présence d'une forte concentration de nanoparticules, la sécrétion des cytokines n'est pas détectable. Par contre la présence de la MMP-9 a augmenté d'une façon significative après 24 et 48 heures dans les surnageants des cellules traitées, comparativement avec celles qui ne l'ont pas été. Par ailleurs, la sécrétion de la MMP-2 a augmenté seulement après 48 heures pour les concentrations les plus élevées de nanoparticules (10 et 20 μ g/mL d'ADN total). Les études de zymographie ont montré que les MMPs sécrétées sont sous forme proactive. Dans les lysats cellulaires, la MMP-9 a été détectée sous la forme active pour les concentrations les plus élevées. Ceci pourrait être dû à la réaction des macrophages, suite à la phagocytose des nanoparticules, visant à les dégrader.

En plus de jouer un rôle dans la défense de l'organisme, les macrophages sont aussi responsables de l'initiation et du maintien de l'inflammation. On les trouve alors impliqués dans des maladies telles que l'athérosclérose, l'arthrite rhumatoïde et la sclérose en plaques. Des études visant l'élimination des macrophages et/ou du médiateur inflammatoire TNF- α , ont permis de constater la diminution de la sévérité de la maladie inflammatoire.

Lors de notre travail, notre approche a consisté à développer des nanoparticules à base de Ch et de PEI pour la complexation d'ADN et d'ODN anti-TNF- α pour induire l'apoptose des macrophages et inhiber la synthèse de la cytokine.

Tout d'abord, nous avons comparé l'efficacité du Ch et du PEI de différents poids moléculaires à induire l'apoptose chez les macrophages en utilisant différentes concentrations de polymères (0.01, 0.02 et 0.05 % pour le Ch ; 0.225, 0.45 et 0.9 mg/mL pour le PEI). Pour ce faire, nous avons procédé à la complexation du plasmide pORF contenant le gène Bax- α (pORF-Bax- α) avec les différents polymères et évalué la viabilité cellulaire en utilisant le test MTT. Les résultats ont démontré que la complexation du plasmide avec le Ch, quelques soient les conditions utilisées, n'a pas induit de mortalité cellulaire. Ceci a donc conduit à son élimination et à l'utilisation de la PEI pour les études suivantes. Les conditions optimales pour l'induction de l'apoptose par les nanoparticules ont été sélectionnées en éliminant celles où le PEI provoque la mort cellulaire lorsqu'il est utilisé seul. C'est notamment le cas lorsque les macrophages sont traités avec de la PEI de masse moléculaire moyenne (750 000 kDa) et élevée (1 000 000 kDa). L'utilisation de la PEI de basse (25 000 kDa) masse moléculaire n'a pas induit de cytotoxicité cellulaire lorsqu'elle est utilisée seule, alors que la viabilité des macrophages a diminué de façon significative suite à la complexation avec le plasmide Bax- α .

L'efficacité du PEI par rapport au Ch lui est conférée par ses capacités de tamponner l'environnement de l'endosome. Cette propriété est expliquée par la théorie de l'éponge à

protons qui se résume comme suit : - Le PEI possède des groupements amines dont une petite partie est protonée à pH physiologique (7.4). - Une fois dans le compartiment endosomal (pH acide), le PEI capture des protons. - Ceci conduit alors au gonflement et à l'éclatement de l'endosome. Cet éclatement précoce de l'endosome permet la libération de l'ADN ou de l'ODN avant leur dégradation dans l'environnement agressif de l'endosome.

Le traitement des macrophages par les nanoparticules a permis d'induire l'apoptose dans 67.8% des cellules, après 24 heures. L'utilisation du plasmide contenant le gène bax- α , sans complexation, a montré des résultats similaires au témoin (cellules non traitées). Ce qui démontre que la complexation du plasmide avec le PEI est nécessaire à l'induction de l'apoptose par le gène Bax- α .

Par ailleurs, la complexation du TNF- α antisens, dans le but d'empêcher la transcription et la traduction du TNF- α , a permis d'induire une inhibition significative de la synthèse de la cytokine de 15%.

En conclusion, la possibilité de cibler des macrophages par des nanoparticules chargées doit être approfondie compte tenu des retombées thérapeutiques notamment pour les maladies inflammatoires où ces cellules jouent un rôle majeur. De plus, ce savoir-faire peut être couplé au développement de nouveaux biomatériaux pour contrôler l'inflammation.

ABSTRACT

Nanotechnology is expected to become one of the basic technologies for the healthcare delivery of therapeutic components in the next years. Based on the past years research, cell and tissue targeting, aiming to the treatment of several pathologies, figure among the most exciting and promising perspectives for the future.

To achieve a successful delivery of biologically active substances to the cells, it is necessary to develop nanometric systems that are able to carry and facilitate the internalization of an active therapeutic agent by the cells, in order to induce a desired effect.

For example, polymeric-based nanoparticles are used to deliver nucleic acids (RNA, DNA and oligodeoxynucleotides) to the cells. For this purpose, polycationic polymers displaying a positive charge are used for the complexation of the negatively charged nucleic acids. Nanoparticle formation is allowed by the electrostatic interaction between the polycation (polymer) and the polyanion (nucleic acid). As a consequence, the nucleic acids are condensed, and their entry into the cell, via the membrane, is facilitated. In addition, they are protected from the enzymatic degradation once in the biological milieu. This kind of nanoparticles has very promising application in gene therapy, which consists in the introduction of the genetic material that may induce or inhibit the expression of a protein, with the aim to achieve a given therapeutic effect.

The choice of non-viral nanovectors is dictated by the major advantages they display, in comparison to the viral systems. They possess a low cytotoxic effect, can be designed with various drugs, especially those that are susceptible to be degraded in the physiological fluids, are less expensive, are simpler to synthesize and can easily be produced at a large scale.

In the present work we used two polycationic polymers: the chitosan (Ch) and polyéthylèneimine (PEI), for the complexation of DNA and oligodeoxynucleotides (ODN).

The first part of our work consisted on the use of Ch for the synthesis of nanoparticles that contains the VR1412 plasmid with a β -galactosidase (β -gal) protein-encoding gene. Ch was chosen because its known biocompatibility and the encouraging results obtained by other researchers regarding its use as a vector for DNA plasmid.

It is well known that the macrophages intercept and ingest the nanoparticles after their intravenous injection. However, very little has been reported on the effect of nanoparticle internalization on the macrophages, especially about the inflammatory effect.

The first part of our work consisted on a time course (1, 6 and 24 hours) treatment of THP-1 human macrophage cell line with Ch-DNA nanoparticles at different concentrations. After each period, the secretion of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10 cytokines as well as metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) and their inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2) were measured by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Since MMPs play an important role in the degradation of the extracellular matrix of tissues, the gelatinolytic activity of MMP-2 and MMP-9 was evaluated by zymography. This activity was evaluated in cell supernatants and in cell lysates. The results showed that, even in the presence of high concentrations of Ch-DNA nanoparticles, cytokine secretion was not detected. On the contrary, the secretion of MMP-9 increased significantly after 24 and 48 hours in the cell supernatants after treatment of the cells. However, the secretion of the MMP-2 augmented only after 48 hours, for the highest concentrations (10 and 20 μ g/mL total DNA).

Zymography studies showed that the secreted MMPs were in a proactive form. However, MMP-9 was detected in an active form in cell lysates when the highest concentrations were used. This fact could be due to the macrophages' reaction against the internalized nanoparticles, aiming to degrade them.

In addition to their major role in the organism's defence, the macrophages are also responsible of the initiation and maintenance of inflammation, which lead to the development of several diseases such as atherosclerosis, rheumatoid arthritis and multiple sclerosis. This has been evidenced by several studies that reported on a decrease of the severity of inflammatory diseases after macrophage elimination and inhibition of the inflammatory mediator TNF- α .

Using this approach, the second part of our work aimed to induce apoptosis and inhibit TNF- α secretion after treatment of the THP-1 cells by polymeric nanoparticles loaded with a Bax- α plasmid or antisense TNF- α oligodeoxynucleotides (ODN). Ch and PEI were used for the condensation of the Bax- α plasmid and their potential on apoptosis induction was evaluated. PEI was used for complexation with the anti-TNF- α ODN and the nanoparticles incubated with the cells to study the inhibition of TNF- α secretion by the macrophages.

First, we compared the efficacy of Ch and PEI with different molecular weights (MW) to induce the mortality of the macrophages. Different concentrations of the polymers were used for treatment of the cells (0.01, 0.02 and 0.05 % for Ch ; 0.225, 0.45 et 0.9 mg/mL for PEI). Each condition was used for the complexation of the pORF- Bax- α plasmid and the obtained nanoparticles were used for treatment of THP-1. After the incubation period, cell viability was measured by the MTT test.

The results demonstrated that treatment of THP-1 with the nanoparticles, obtained upon the complexation of the plasmid with the Ch, did not induce a significant decrease in cell

viability in comparison to the negative control. When used alone, PEI having medium and high MW induced significant cell mortality by itself. This resulted in the elimination of Ch and PEI with medium and high MW for the subsequent studies.

When PEI having a low MW (25 000 kDa) was used alone, it did not induce a significant decrease in cell viability by itself. However, when complexed with the Bax- α plasmid, the nanoparticles produced a significant 2-folds diminution in THP-1 viability.

The efficacy of PEI versus Ch is conferred by its capacity to buffer the endosome environment. This property is explained by the sponge theory resulting from the fact that only a fraction of PEI amino groups are protonated at the physiological pH. After the internalization of PEI nanoparticles by the cells and their capture into endosomal compartments that display an acidic pH, PEI acquires the capacity to capture protons. This causes osmotic swelling and subsequent endosome disruption, leading to the release of endocytosed nucleic acids into the cytosol.

Cytometry study allowed concluding that treatment of the macrophages by PEI-Bax- α nanoparticles resulted in the induction of apoptosis in 67.8% of THP-1 cells after 24 hours. The use of the plasmid alone showed the same results than the control (untreated cells).

The study of TNF- α inhibition by PEI-anti-TNF- α ODN nanoparticles showed an inhibition of TNF- α synthesis by 15%.

In conclusion, the targeting of macrophages by nucleic acids nanoparticles represents a very exciting alternative for the treatment of inflammatory diseases. In addition, the use of the nanoparticles could be combined with new biomaterials to control inflammation or potentiate a desired effect. However, the synthesis of the polymeric nanoparticles should be optimized and studied more extensively.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	V
RÉSUMÉ	VI
ABSTRACT	X
LISTE DES FIGURES	XX
LISTE DES TABLEAUX	XXIV
LISTE DES CIGLES ET ABRÉVIATIONS	XXV
 CHAPITRE I	 1
1. INTRODUCTION.....	1
1.1 HISTORIQUE.....	1
1.2 LA THÉRAPIE GÉNIQUE	2
1.3 APPROCHE ET OBJECTIFS	3
1.3.1 Approche.....	3
1.3.2. Objectifs.....	4
 CHAPITRE II.....	 8
2. ÉTAT DES CONNAISSANCES.....	8
2.1. SYSTÈMES UTILISÉS POUR VÉHICULER LES ACIDES NUCLÉIQUES AUX CELLULES	8
2.1.1. <i>Systèmes viraux</i>	9
- Rétrovirus	9
- Adénovirus	9
- Virus adénoviraux-associés (AAVs)	10
- Herpesvirus.....	10
- Lentivirus	10
2.1.2 <i>Systèmes non-viraux</i>	10
- Liposomes	11

- Nanoparticules et nanocapsules.....	13
2.2. PROPRIÉTÉS REQUISES POUR UN SYSTÈME OPTIMAL	14
2.3. STRATÉGIES POUR AMÉLIORER LA VECTORISATION D'ADN	14
2.3.1. <i>Polymères naturels</i>	14
2.3.2. <i>Polymères synthétiques</i>	15
2.3.3. <i>Pégylation</i>	17
2.4. NANOVECTEURS D'ADN ET BARRIÈRES CELLULAIRES	18
2.4.1 <i>Membrane cellulaire et ciblage spécifique</i>	20
2.4.2 <i>Endosome et lysosome</i>	21
2.4.2.1. Agents endosomo et lysosomo-tropiques	23
- Chloroquine	23
- Saccharose	23
- Polyvinylpyrrolidone (PVP).....	24
2.4.2.2. Les polymères	24
- Polyéthylèneimine (PEI)	24
- Polylysine avec imidazole	26
- Acide poly(propylacrylique) (PPAA)	26
- Acide Poly(2-éthacrylique) (PEAA).....	27
- N-isopropylacrylamide (NIPAM).....	27
2.4.2.3 Domaines de transduction de protéines (protein transduction domain : PTD).....	28
2.4.2.4 Les polymères Adénovirus/Peptides fusogéniques	29
2.4.3 <i>Le noyau</i>	30
2.4.3.1 Signal de localisation nucléaire (SLN)	32
2.4.3.2 Antigène T du SV40.....	33
2.4.3.3 Histones	34
2.4.3.4 Séquence TAT.....	34
2.5 ASPECTS PHYSICO-CHIMIQUES	35
2.5.1 <i>Interaction entre le polymère et l'ADN pour former les nanoparticules</i>	35

2.5.2 Aspects physico-chimiques des nanoparticules en solution	36
2.5.3 Taille et distribution des nanoparticules	37
2.5.4 Charge de surface	37
2.5.5 Influence du pH sur le potentiel Zeta	39
2.5.6 Hydrophobie/hydrophilie	40
2.5.7 Caractérisation physico-chimique des nanoparticules	40
2.6 BIOCOMPATIBILITÉ DES SYSTÈMES NON VIRALISÉS UTILISÉS POUR VÉHICULER L'ADN	42
2.6.1 Polylysine (PLL)	44
2.6.2 Poly(cyanoacrylate)	44
2.6.3 Chitosane	45
2.7 LES MACROPHAGES COMME CIBLE THÉRAPEUTIQUE	47
2.7.1 Arthrite rhumatoïde	48
2.7.2 Thérapie anti-tumorale	49
2.7.3 Thérapie anti-HIV	51
2.7.4 Thérapie cardiovasculaire	52
CHAPITRE III	54
3. POTENTIEL THÉRAPEUTIQUE DES SYSTÈMES NANOPARTICULAIRES POUR CIBLAGE DES MACROPHAGES	54
3.1 ABSTRACT	57
3.2 INTRODUCTION	58
3.3 MACROPHAGE TARGETING	61
3.3.1 Phagocytosis and nanoparticle uptake versus efficacy	61
3.3.2 Physicochemical properties and nanoparticle uptake	66
3.4 NANOPARTICLES AND MACROPHAGE CYTOTOXICITY	68
3.5 NANOPARTICULATE SYSTEMS FOR MACROPHAGE-MEDIATED THERAPIES	71
3.5.1 Bacterial infectious diseases	72
3.5.2 Viral infectious disease: AIDS Therapy	74
3.5.3 Inflammatory diseases	75

3.5.3.1 Atherosclerosis and restenosis	76
3.5.3.2 Rheumatoid arthritis (RA)	78
3.5.3.3 Neuroinflammatory diseases.....	81
3.6 CONCLUSIONS.....	82
3.7 AKNOWLEDGMENTS	84
3.8 REFERENCES	84
 4. MATÉRIEL ET MÉTHODES	103
4.1 EFFET DE L'INTERNALISATION DES NANOPARTICULES	103
4.1.1 Préparation des nanoparticules de Ch-ADN.....	103
4.1.2. Marquage des nanoparticules	104
4.1.3. Culture cellulaire	105
4.1.4 Étude de l'internalisation des nanoparticules par les macrophages.....	105
4.1.4.1 Cytométrie en flux.....	105
4.1.4.2 Microscopie à fluorescence.....	106
4.1.5 - Réaction des macrophages aux nanoparticules	106
4.1.5.1 Cytokines	106
4.1.5.2 Métalloprotéinases (MMPs) et leurs inhibiteurs (TIMPs).....	106
4.1.5.3 Zymographie	107
4.2 INDUCTION DE L'APOPTOSE ET INHIBITION DU TNF- α	108
4.2.1 Les polymères	108
4.2.2 Plasmides et Oligodéoxynucleotides (ODN)	108
4.2.3 Synthèse des nanoparticules	108
4.2.4 Culture cellulaire	109
4.2.5 Étude de cytotoxicité	109
4.2.6 Induction de l'apoptose	110
4.2.7 Étude de l'inhibition du TNF- α	111

CHAPITRE V	112
5. EFFETS DE L'INTERNALISATION DES NANOPARTICULES À BASE DE CHITOSANE SUR LES THP-1.....	112
5.1 ABSTRACT	115
5.2 INTRODUCTION	116
5.3 MATERIALS AND METHODS.....	118
5.3.1 <i>Preparation of Ch-DNA nanoparticles</i>	118
5.3.2 <i>FITC nanoparticles labeling</i>	118
5.3.3 <i>Cell culture</i>	119
5.3.4 <i>Internalization studies</i>	119
5.3.4.1 <i>Flow cytometry</i>	119
5.3.4.2 <i>Fluorescence microscopy</i>	119
5.3.5 <i>ELISA for Cytokines, MMPs and TIMPs</i>	120
5.3.6 <i>MMP-2 and MMP-9 gelatinolytic activity</i>	120
5.3.6.1 <i>MMP-2 and MMP-9 detection in cell supernatants</i>	121
5.3.6.2 <i>MMP-2 and MMP-9 activity in cell lysates</i>	121
5.3.7 <i>Statistical analyses</i>	122
5.4 RESULTS	122
5.4.1 <i>Nanoparticle uptake by macrophages</i>	122
5.4.2 <i>ELISA for Cytokine, MMP and TIMP release</i>	124
5.4.3 <i>Zymography studies</i>	127
5.4.3.1 <i>MMP-9 and MMP-2 in cell supernatants</i>	127
5.4.3.2 <i>MMP-9 and MMP-2 activity in cell lysates</i>	130
5.5 DISCUSSION	130
5.6 CONCLUSION	132
5.7 ACKNOWLEDGMENTS	133
5.8. REFERENCES	133

CHAPITRE VI	138
6. UTILISATION DES NANOPARTICULES POLYMÉRIQUES POUR INDUCTION DE L'APOPTOSE ET INHIBITION DU TNF-α.....	138
6.1 ABSTRACT	141
6.2 INTRODUCTION	142
6.3 MATERIALS AND METHODS.....	143
6.3.1 Nanoparticle synthesis	143
6.3.2 Plasmids and Oligodeoxynucleotides.....	144
6.3.3 Cell culture:	145
6.3.4 Cytotoxicity study:.....	145
6.3.5 Apoptosis study	145
6.3.6 TNF- α inhibition study.....	146
6.3.7 Statistical analyses	146
6.4 RESULTS.....	147
6.4.1 DNA condensation with PEI and Ch.....	147
6.4.2 Cytotoxicity of PEI and Ch.....	148
6.4.3 Cell transfection and apoptosis induction.....	151
6.4.4 TNF- α inhibition.....	153
6.5 DISCUSSION	154
6.6 CONCLUSION	158
6.7 ACKNOWLEDGMENTS	159
6.9 REFERENCES.....	159
CHAPITRE VII.....	165
7. DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION	165
ANNEXE 1.....	177
RÉFÉRENCES	188

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1 Structure chimique de poloxamères. En variant le nombre de a et b, différents poloxamères peuvent être obtenus.....	16
Figure 2.2 Structure des poloxamines.....	16
Figure 2.3 Représentation schématique du passage d'un plasmide dans une cellule et expression de la protéine.....	19
Figure 2.4 Cheminement des complexes du milieu extracellulaire vers le noyau, après liaison avec les récepteurs membranaires (adapté de Kircheis et al., 2001).....	22
Figure 2.5 Structure du PEI.....	266
Figure 2.6 Structure chimique du PPAA.	27
Figure 2.7 Schéma simplifié de l'import nucléaire (adapté de Cokolet al., 2000).....	333
Figure 2.8 Effet du pH sur le potentiel Zeta.....	40
Figure 2.9 Comparaison entre l'efficacité de vectorisation et la toxicité des différentes méthodes de transfection (adapté de Luo et Saltzman, 2000).....	466
Figure 3.1 Summary of the different methods developed for the preparation of PACA nanoparticles with the corresponding types of nanoparticles produced. (Reproduced with permission from reference [16]).....	6060

Figure 3.2 Endocytosis of PACA nanospheres by J774 macrophages in culture cells as observed by transmission electron microscopy. (A) Interactions of nanospheres with the cell membrane (arrows). (B) Endocytosis of a nanosphere. (C) Nanospheres in phagosomes (arrows). (Reproduced with permission from reference [16]).622

Figure 3.3 Time-course detection of MMP-9 and MMP-2 gelatinolytic activity in cell supernatants was determined by zymography. Densitometry quantification of lysis zones indicates a significant increase of MMP-9 activity in comparison with the control after 24 hours. MMP-2 secretion was similar to that of the control and not affected by the incubation periods and nanoparticle concentrations.....711

Figure 3.4 Schematic representation of the role of macrophages in the initiation and maintenance of inflammation.....766

Figure 3.5 This simplified schematic representation illustrates the central role of TNF- α secreted by macrophages in rheumatoid arthritis (Adapted from reference [138]).799

Figure 4.1 Nanoparticules à base de chitosane et ADN observées en MFA1044

Figure 5.1 The kinetics of FITC labeled Ch-DNA nanoparticles uptake by THP-1 was evaluated by flow cytometry after 1, 6 and 24 h (a). The FITC fluorescence was detected for the cells which were incubated with labeled nanoparticles. Cells alone and those which were incubated with non-labeled nanoparticles were used as controls. In these cases, no signal was detected. A histogram representation of the fluorescence as a function of incubation time is shown in the bottom diagram (b).1233

Figure 5.2 After Ch-DNA nanoparticle FITC labelling, their uptake by THP-1 macrophages is showed by fluorescence microscopy following different incubation periods (a: control; b: after 1 hour; c: after 6 hours; d: after 24 hours).1244

Figure 5.3 MMP-9 (a), MMP-2 (b) and TIMP-1 (c) release were evaluated by ELISA in THP-1 cell supernatants after incubation with different concentrations of Ch-DNA nanoparticles; (*: $p < 0.05$). 1277

Figure 5.4a Time-course detection of MMP-9 and MMP-2 gelatinolytic activity in cell supernatants was determined by zymography (a). (b). MMP-2 secretion was similar to that of the control and not affected by the incubation periods and nanoparticle concentrations (c). (O.D.: optical density; *: $p < 0.05$). 12828

Figure 5.4b Densitometry quantification of lysis zones indicated a significant increase of MMP-9 activity in comparison with the control after 24 hours (O.D.: optical density; *: $p < 0.05$). 12929

Figure 5.4c MMP-2 secretion was similar to that of the control and not affected by the incubation periods and nanoparticle concentrations (c). (O.D.: optical density). 12929

Figure 5.5 Time-course detection of MMP-9 and MMP-2 gelatinolytic activity in THP-1 cell lysates shows an increase of MMP-9 activity after 48 hours of incubation with high concentrations of nanoparticles (10 and 20 μg DNA content). MMP-2 was not detected while the active form of MMP-9 was present. 1300

Figure 6.1 The Bax- α plasmid was condensed with Ch and PEI and the samples were loaded on a 1% agarose gel. Three different concentrations were used for each polymer (C1: 0.01%; C2: 0.02%; C3: 0.05% for Ch and C1: 0.25 mg/mL; C2: 0.45 mg/mL; C3: 0.9 mg/mL for PEI) with the different molecular weights (L: low MW; M: medium MW; H: high MW). 1477

Figure 6.2 THP-1 cells were treated with different molecular weight PEI (L: low; M: medium; H: high) at three different concentrations (C1: 0.25 mg/mL; C2: 0.45 mg/mL; C3: 0.9 mg/mL). When the cells were incubated with PEI alone for 24 hours, no cytotoxic effect was induced at low molecular weight. On the contrary, at medium and high MW, a dramatic decrease in cell viability was shown. At low molecular weight and a concentration of 0.9 mg/mL, the complexation with Bax- α plasmid resulted in almost 50% decrease of cell viability (*: $P < 0.05$)..... 14949

Figure 6.3 THP-1 cells were treated with different molecular weight Ch (L: low; M: medium; H: high) at three different concentrations (C1: 0.01%; C2: 0.02%; C3: 0.05%). No significant difference was seen in cell viability after the treatment of the cells with chitosan alone or complexed with Bax- α plasmid. 1500

Figure 6.4 The THP-1 cells were treated with PEI- Bax- α nanoparticles. In this experiment the nanoparticles were made by varying the concentration of the plasmid, while the concentration of PEI was constant (0.9 mg/mL). The results indicate that the cell viability was decreased by complexing Bax- α plasmid with PEI, but no significant effect was observed by varying DNA concentration(*: $p < 0.05$). 1511

Figure 6.5 The DNA laddering technique did not show any DNA fragmentation of the THP-1 cells after treatment with the nanoparticles, PEI and Bax- α alone..... 1522

Figure 6.6 Annexin V-PE kit was used for the detection of apoptosis at earlier stage by flow cytometry. When 5 μ g of DNA was complexed with PEI, the apoptosis rate was 2-fold higher than that of the control and Bax- α alone (*: $p < 0.05$). 1533

Figure 6.7 The results show that TNF- α secretion was inhibited by 15% after a complexation with PEI, while this effect was not observed when the ODNs were used in naked form (*: $p < 0.05$). 1544

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 Séquences des PTD les plus fréquemment utilisées (Merdan et al., 2002)	2929
---	------

Tableau 2.2 Méthodes utilisées pour la caractérisation physico-chimique des nanoparticules.....	41
--	----

Tableau 5.1 Release of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10 was assessed after cell incubation with different concentrations of Ch-DNA nanoparticles. Only cell treatment with LPS (positive control) allowed cytokine detection in cell supernatants (*: $p < 0.05$), (-): represents the values which are under the detection limit.	1255
--	------

LISTE DES CIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique

ANTP: Antennapedia protein

ARN : acide ribonucléique

Ch : chitosane

CMV : Cytomégalo virus

DEAE : diethylaminoethyl

DOPE : dioléoylphosphatidyléthanolamine

DOTMA : 2,3-bis(oléoyl)oxipropylviral triméthylammonium

FITC : fluorescein-5-isothiocyanate

kDa : kilodalton

IL-10 : interleukine-10

IL-1 β : interleukine-1 beta

IL-6 : interleukine-6

LPS : lipopolysaccharide

MFA : microscopie à force atomique

MMP : métalloprotéinase

MMP: matrix metalloproteinase

MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide

Na₂SO₄ : sulfate de sodium

NaOH : hydroxyde de sodium

nm : nanomètre

ODN : oligonucléotide

PEAA : Acide Poly(2-éthacrylique)

PEG : polyéthylène glycol

PEI : polyéthylèneimine

PLL : Polylysine

PM: poids moléculaire

PPAA : Acide poly(propylacrylique)

PVP : Polyvinylpyrrolidone

RSV: Rous Sarcoma Virus

siRNA : Small interfering ribonucleic acids

TAT: TransActivator of Transcription

TIMP : tissue inhibitor of metalloproteinase

TIMP; tissue inhibitor of matrix metalloproteinases

TNF- α : tumor necrosis factor-alpha

CHAPITRE I

1. INTRODUCTION

1.1 Historique

Au milieu des années '50, des scientifiques ont montré que les cellules sont capables d'internaliser les acides nucléiques extraits à partir de virus et les exprimer en protéines (Alexander et al., 1958; Holland et al., 1959). Le processus par lequel de l'ADN exogène est introduit dans la cellule est connu sous le nom de transfection.

Les années '60 ont vu alors les efforts des chercheurs dirigés vers l'optimisation de livraison des acides nucléiques aux cellules. Ils ont trouvé que la combinaison de l'ADN avec des polymères positivement chargés conduisait à la neutralisation des charges négatives de l'ADN et permettaient son internalisation par les cellules plus facilement (Smull et Ludwic, 1962). L'une des techniques utilisait le polymère organique diéthylaminoéthyl (DEAE)-dextrane et l'autre, le phosphate de calcium (Vaheri et Pagano 1965; Graham et Van Dereg, 1973).

La naissance de la biologie moléculaire moderne à la fin des années 70 a permis l'éclosion de techniques pour l'expression de plasmides recombinants dans des cellules en culture (Mulligan et al., 1979). La transfection des cellules avec des acides nucléiques a permis alors de produire des lignées cellulaires stables que l'industrie pharmaceutique utilise aujourd'hui pour fabriquer des protéines recombinantes à usage médical thérapeutique.

Les années 80 ont permis d'explorer l'ensemble des gènes humains (le génome) et de les répertorier.

Les premières tentatives thérapeutiques sont apparues en 1990 grâce à une stratégie *ex vivo* durant laquelle les cellules du patient sont prélevées et cultivées en laboratoire en présence des vecteurs. Une fois leur ADN modifié, les cellules sont alors réinjectées au patient. Les premières maladies que l'on voulait viser étaient la myopathie de Duchenne et l'hémophilie (Webster et Blau, 1990 ; Anson et al., 1987).

Aujourd'hui, grâce à la connaissance du génome humain et des techniques de biologie cellulaire et moléculaire, la thérapie génique représente l'un des outils les plus prometteurs pour le traitement d'un large spectre de maladies (génétiques, infectieuses, cancer, déficits enzymatiques, etc.).

1.2 La thérapie génique

Elle vise à :

- Remplacer un gène défectueux, c'est-à-dire une séquence d'ADN, par un gène normal et fonctionnel qui sera à l'origine de la synthèse de la protéine manquante ou défectueuse.
- Au sens large, à introduire dans la cellule un gène qui sera à l'origine de la synthèse d'une protéine, pas nécessairement présente dans l'organisme normal, mais susceptible d'avoir, dans des circonstances particulières, un effet bénéfique pour le malade.
- Introduire dans une cellule un matériel génétique (gène, portion de gène, ADN, ARN, oligonucléotides) qui va constituer un moyen thérapeutique.

La thérapie dite anti-sens, qui consiste à neutraliser une séquence d'ARN messager par des oligonucléotides (ODN) et empêcher l'expression d'une protéine en fait partie. Une autre approche est basée sur l'utilisation des ribozymes découverts par Cech (1981) et le groupe de Altman (Guerrier-Takada et al., 1983). L'avantage principal des ribozymes réside dans leurs propriétés enzymatiques permettant de cliver les molécules d'ARN

messenger. Depuis 2001, et dans la même optique, les chercheurs s'intéressent à l'utilisation de petites séquences d'ARN (Small interfering RNA; siRNA) pour inhiber la production d'une protéine donnée.

1.3 Approche et objectifs

1.3.1 Approche

Malgré les différents outils utilisés en thérapie génique, il reste que le succès de cette dernière est tributaire des barrières biologiques. Elles sont constituées notamment des milieux physiologiques qui renferment des enzymes qui dégradent les acides nucléiques (nucléases) et des cellules elles-mêmes qui opposent une résistance à l'entrée du matériel génétique par leur membrane. Pour surmonter cet inconvénient, l'attention de plusieurs chercheurs s'est dirigée vers le ciblage intracellulaire en utilisant des nanovecteurs. Ces nanovecteurs peuvent être sous forme de liposomes, nanocapsules ou nanoparticules, avec des tailles inférieures au micron, le plus couramment 100-200 nm (Moghimi et Szebeni, 2003). Les nanovecteurs sont développés pour préserver l'intégrité des acides nucléiques, augmenter leur internalisation par la cellule et améliorer le taux de transfection.

Dans le chapitre 2, les différents systèmes et approches utilisés sont détaillés. Parmi, ces systèmes, les polymères polycationiques sont utilisés pour condenser l'ADN et neutraliser sa charge négative, suite à des interactions électrostatiques, pour faciliter son passage dans l'espace intracellulaire. Parmi ces polymères, le chitosane est utilisé à cause de sa biocompatibilité (schmidt et al., 2003). Le PEI a aussi démontré une bonne efficacité conférée par sa structure et ses propriétés physico-chimiques (Kircheis et al., 1999) (détaillées dans le chapitre 2).

Pour nos études, nous avons choisi d'utiliser les macrophages comme modèle cellulaire car ils sont majoritairement impliqués dans la phagocytose des nanoparticules, suite à leur administration intravasculaire. De plus, les macrophages constituent une cible thérapeutique très importante, car ils sont impliqués dans différentes maladies inflammatoires et infectieuses (chapitre 3). D'ailleurs, plusieurs stratégies thérapeutiques ont été développées pour cibler les macrophages qui sont attirés au site d'inflammation, dans le but de diminuer la sécrétion des cytokines inflammatoires qui font aggraver la maladie et conduire à sa chronicité (ex. cas de l'arthrite rhumatoïde).

Le chapitre 3 est présenté sous forme de revue de littérature faisant le point sur le potentiel thérapeutique des nanovecteurs utilisés pour cibler les macrophages.

1.3.2. Objectifs

Quoique de nombreux travaux aient porté sur l'utilisation de polymères pour le développement des nanoparticules afin de véhiculer l'ADN et les oligonucléotides aux cellules, très peu a été rapporté sur les effets (en dehors de l'efficacité de transfection) suite à l'internalisation des nanoparticules par les cellules.

Le chapitre 5 porte justement sur les effets des nanoparticules de chitosane après leur mise en contact avec la lignée de macrophages humains THP-1. Les nanoparticules sont formées suite à la complexation du polymère et du plasmide VR1412 qui code pour la protéine β -Galactosidase (β -Gal). Cette enzyme est codée par le gène *Lac Z* incorporé dans le plasmide; sa détection au niveau des cellules et tissus atteste de l'efficacité d'expression de la protéine. Ce plasmide a été utilisé dans des études préalables ayant fait l'objet d'un article publié dans « *Biomaterials* » (Annexe 1) (Corsi et al., 2003).

Les objectifs du travail du chapitre 5 dont les résultats sont publiés dans le journal « *Biomaterials* » ont consisté à :

- Déterminer et visualiser l'internalisation des nanoparticules par les macrophages en fonction du temps ;
- Déterminer les effets de l'internalisation des nanoparticules et de leur concentration sur la sécrétion des cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6 et IL-10) ;
- Déterminer la sécrétion des métalloprotéinases (MMP-2 et MMP-9) et leur production intracellulaire suite au traitement des macrophages avec différentes concentrations de nanoparticules ;
- Déterminer la sécrétion des inhibiteurs des MMPs (TIMP-2 et TIMP-1) afin de déceler un déséquilibre potentiel entre les métalloprotéinases et leurs inhibiteur ; ce déséquilibre étant connu pour son implication dans les pathologies dégénératives (ex. arthrite rhumatoïde).

Le chapitre 6 traite de l'application des nanoparticules polymériques pour l'induction de l'apoptose et l'inhibition de la sécrétion du TNF- α chez les macrophages. Les résultats de ce travail sont soumis pour publication dans le journal « *Biomaterials* ».

Une des stratégies qui peut être utilisée pour le traitement des maladies inflammatoires consiste à moduler ou inhiber l'action de certaines cytokines. Ces dernières jouent un rôle de régulation important dans l'initiation, le maintien et/ou l'amplification ainsi que la fin de la réponse inflammatoire. Il existe plus d'une cinquantaine de cytokines identifiées, et de plus en plus d'information devient disponible, par rapport à leurs récepteurs, mécanismes d'action et voie de transduction.

Parmi les autres cytokines, le TNF- α attire l'attention car elle est considérée comme l'une de celles qui initient la cascade inflammatoire (voir chapitre 3). De ce fait, plusieurs approches sont utilisées pour contrôler sa synthèse, sa libération et/ou les effets qui lui sont associés.

Des recherches détaillées ont permis de mettre en évidence son rôle prééminent dans la médiation de l'inflammation ainsi que l'initiation des réactions inflammatoires (Clauss et al., 2001) ; ce qui conduit à l'établissement d'une multitude de maladies inflammatoires et auto-immunes (revue par Atzeni et al., 2005). En effet, le TNF- α induit la production d'autres cytokines pro-inflammatoires telles que les interleukines (IL)-1 et 6. Ces dernières provoquent la migration des leucocytes, en augmentant la perméabilité de la paroi endothéliale et l'expression des molécules d'adhérence par les cellules endothéliales et les leucocytes et en activant la fonction des neutrophiles et éosinophiles.

Par ailleurs, le TNF- α a été suggéré comme étant une cytokine pro-inflammatoire clé qui affecte directement les chondrocytes dans un modèle murin utilisé par Cho et al. (2003). D'autres études ont montré que le TNF- α induit l'expression de plusieurs enzymes protéolytiques incluant les métalloprotéinases 1, 3 et 9 dont l'action est associée à la destruction de la matrice extracellulaire du cartilage (Fraser et al., 2001 ; Freemont et al., 1997 ; Jain et al., 2001). De plus, il a été démontré qu'il est hautement impliqué dans la surrégulation de la BMP-2 et de la BMP-6 qui se sont révélées être exprimées dans le synovium arthritique (Lories et al., 2003).

Les activités biologiques du TNF- α laissent donc entrevoir les dangers relatifs à une sécrétion excessive et non contrôlée, justifiant les efforts mis en œuvre pour la modulation de ses effets.

Dans le travail décrit dans le chapitre 6, nous avons, dans un premier temps, utilisé le PEI et le Ch pour la complexation du plasmide pORF contenant le gène Bax- α , connu pour son rôle dans le déclenchement de l'apoptose. Lors de cette expérience, les polymères ont été utilisés à différents poids moléculaires et concentrations pour la synthèse des nanoparticules. Dans un deuxième temps, suite à la sélection des conditions optimales, nous avons utilisé le PEI pour la complexation d'oligonucléotides antisens.

Les objectifs de cette étude sont les suivants :

- Déterminer les meilleures conditions pour la complexation du plasmide et pour l'induction de la mortalité, de façon spécifique, par le plasmide ;
- Comparer l'efficacité du PEI par rapport au Ch ;
- Déterminer l'influence de la masse moléculaire sur la cytotoxicité cellulaire ;
- Déterminer les meilleures conditions pour l'induction de l'apoptose ;
- Déterminer le potentiel d'inhibition de la cytokine inflammatoire TNF- α en utilisant des nanoparticules produites suite à la complexation du PEI et d'oligonucléotides anti-sens.

CHAPITRE II

2. ÉTAT DES CONNAISSANCES

Le ciblage des cellules avec des agents thérapeutiques constitue aujourd'hui un défi majeur pour le traitement de plusieurs maladies. Parmi ces agents, les acides nucléiques (ADN, oligonucléotides, ribozymes, ARN, siARN) sont utilisés en thérapie génique.

Même si beaucoup de progrès a été effectué, résultant de plusieurs travaux dans le domaine, véhiculer les acides nucléiques au niveau intracellulaire demeure problématique. En effet, les caractéristiques physico-chimiques des acides nucléiques sont peu favorables à leur administration intracellulaire. De plus, leur exposition aux enzymes présentes dans les milieux biologiques entraîne leur dégradation rapide et leur élimination. Les différents systèmes développés pour contrecarrer ces problèmes sont exposés dans ce chapitre.

2.1. Systèmes utilisés pour véhiculer les acides nucléiques aux cellules

Les principales stratégies pour véhiculer des gènes requièrent des mécanismes à médiation virale, chimique ou physique (Smith, 1995). La compréhension de la biologie moléculaire et des virus recombinants a permis l'utilisation des vecteurs viraux dans une large mesure. Malgré leur avantage indéniable en termes d'efficacité de transfection, des questionnements et des évidences, relatifs à leur sécurité, ont mené les chercheurs à considérer l'approche non virale comme alternative (Glover et al., 2005).

2.1.1. Systèmes viraux

- Rétrovirus

C'est l'un des premiers systèmes de vectorisation utilisés (Joyner et al., 1983 ; Ellis et Bernstein, 1989). Leur matériel génétique est l'ARN. Il produit l'enzyme de transcription "reverse transcriptase" qui permet de transformer l'ARN en ADN qui peut s'intégrer de façon permanente dans l'ADN de la cellule hôte. Pour une utilisation plus sécuritaire en thérapie génique, les rétrovirus sont modifiés afin d'empêcher qu'ils délivrent leur propre matériel génétique.

Leur avantage réside dans leur entrée efficace dans les cellules et le transfert du matériel génétique désiré sans l'introduction des gènes du virus.

Leur désavantage est qu'ils infectent seulement les cellules en division (Miller, 1992). De plus, leur préparation est fastidieuse et coûteuse avec un titre assez bas et une contrainte de taille du gène à insérer. L'expression du gène est très difficile à contrôler et peut causer un dommage au niveau du génome hôte, dû à leur intégration aléatoire.

- Adénovirus

Leur génome est constitué d'une molécule unique d'ADN double-brin linéaire d'environ 35 kb (Graham et Prevec, 1995). Ils peuvent entrer dans n'importe quel type cellulaire et peuvent infecter les cellules qui ne se divisent pas. Ils ont un haut niveau d'expression et sont facilement manipulés. En principe, ils ne s'intègrent pas dans le génome mais ceci reste à confirmer avec des études plus poussées. Ils font cependant face au système immunitaire qui les élimine rapidement. Ils peuvent provoquer des réactions immunogènes sévères (Flotte et Laube, 2001) et même parfois la mort; ce qui a conduit à la suspension temporaire des essais cliniques de thérapie génique aux états-unis (Smaglik, 1999; Raper et al., 2003).

- Virus adénoviraux-associés (AAVs)

Ils sont difficiles à produire en grande quantité et sont limités par la taille d'insert qui peut y être introduite. Leur avantage réside dans l'efficacité de transfection de cellules qui ne se divisent pas (cerveau, muscle, foie et poumons) (Samulski, 1993).

- Herpesvirus

Ils ont la capacité de livrer des gènes de grande taille (10 fois plus que les autres vecteurs). Ils peuvent être produits avec haut titre et sont théoriquement neurotropiques. Leur construction reste très complexe (Fink et al., 1995; Fink et Gloriosco, 1997).

- Lentivirus

Ils sont capables de véhiculer les gènes dans les cellules qui ne se divisent pas mais manquent de spécificité. L'utilisation de ces virus tel que le HIV reste à être améliorée. Des travaux sont en cours pour éliminer les séquences qui provoquent des effets mortels. En effet, ces derniers permettent un haut niveau d'incorporation et d'expression dans les cellules. Cependant, les inconvénients majeurs de ces vecteurs pour le transfert des gènes incluent le manque de spécificité cellulaire, la restriction de la taille d'ADN qui peut être utilisé. De plus, ils induisent des réponses immunitaires (Naldini et al., 1996a; Naldini et al., 1996 b).

2.1.2 Systèmes non-viraux

Ils sont utilisés comme alternative aux systèmes viraux et pour contrecarrer les problèmes qui leur sont associés. Les véhicules de gènes non viraux permettent de construire un auto-assemblage des complexes d'ADN en utilisant des composantes chimiques qui jouent le rôle des protéines dans les systèmes viraux. L'avantage de l'utilisation des

vecteurs non viraux réside, entre autres, dans l'évitement de la construction des virus recombinants qui prend un temps considérable.

Le système le plus simple est l'utilisation d'ADN seul (ADN nu) qui a montré une expression très limitée dans le temps, après injection dans le tissu musculaire (Wolff et al., 1990). Sa dégradation rapide dans les milieux biologiques par les nucléases a mené à développer de nombreux systèmes à base de lipides cationiques (lipoplexes) (Maurer et al., 1999 et Monck et al., 2000). Actuellement, de plus en plus d'intérêt est porté aux vecteurs polymériques (polyplexes) dans lesquels l'ADN est condensé. Cette condensation permet la protection de l'ADN durant son cheminement cellulaire (Dunlap et al., 1997 ; Li et Huang, 2000). L'utilisation des polymères offre des avantages qui consistent à pouvoir les choisir en fonction des applications et de les modifier pour acquérir des propriétés physiologiques et physico-chimiques adéquates.

- Liposomes

Ils sont composés de lipides polaires non miscibles (ex. phospholipides) dans un excès d'eau, donnant naissance à des assemblages hautement ordonnés, concentriques et fermés, sous forme de membrane double couche. Ils peuvent être obtenus sous forme uni ou multi lamellaire. La procédure classique consiste à dissoudre les phospholipides dans un solvant organique qui est ensuite évaporé. Par la suite, la couche lipidique est perturbée en rajoutant un excès d'eau ou tampon. Ceci conduit à la formation spontanée de liposomes multilamellaires de taille hétérogène (0.05-1 μm). La substance d'intérêt peut être dissoute soit dans la phase aqueuse ou lipidique dépendamment de son hydrophilie ou hydrophobie.

La sonication subséquente des liposomes multilamellaires conduit à la formation de liposomes unilamellaires (50-100 nm). Ils peuvent être séparés des plus larges par filtration sur gel (Huang, 1969) ou ultracentrifugation (Barenholz et al., 1977). La sonication peut provoquer l'oxydation des liens insaturés dans les chaînes d'acides gras ou phospholipides (almog et al., 1991). De plus elle peut conduire à la dénaturation et/ou

inactivation des molécules encapsulées (protéines et acides nucléiques) (Leach et al., 2005; Fenske et al., 2002).

L'utilisation des liposomes comme vecteurs d'ADN pour la transfection cellulaire est basée sur les propriétés suivantes :

L'interaction électrostatique spontanée entre les liposomes chargés positivement et l'ADN chargé négativement; ce qui conduit à la condensation des acides nucléiques.

Les complexes liposomes/ADN ont une charge positive nette qui permet leur association avec la surface cellulaire qui possède une charge négative.

Les propriétés fusogéniques des liposomes cationiques qui peuvent induire la fusion et/ou la déstabilisation de la membrane facilitant ainsi, la libération de l'ADN complexé, dans l'espace intracellulaire (Pedroso et al., 2001).

En 1986, Behr a démontré que les liposomes cationiques peuvent se complexer à l'ADN et le condenser. Par la suite Felgner et ses collaborateurs (1987) ont proposé ce système pour le transport intracellulaire de l'ADN. Les liposomes proposés sont composés de lipides cationiques à base de chlorure 2,3-bis(oléoyl)oxipropylviril triméthylammonium (DOTMA) et de dioléoylphosphatidyléthanolamine (DOPE), qui devint un agent de transfection commercialisé sous le nom de lipofectin® (Invitrogen Life technologies). L'efficacité de ce système réside dans sa mixture, où DOPE forme des liposomes conjointement avec le lipide cationique.

Les lipides cationiques qui contiennent des amines quaternaires n'augmentent pas la transfection. Les lipides cationiques DOTMA et DOTAP ont de faibles capacités tampon à cause de la présence d'une molécule cationique par lipide. C'est pour cela qu'ils sont conjointement utilisés avec un excès de DOPE afin d'augmenter l'efficacité de transfection. Les liposomes enrichis en DOPE semblent favoriser la libération des substances actives à cause de leur capacité endosomolytique. Elle leur est conférée par leur tendance à changer de configuration à pH acide. Leur passage d'une configuration de bicouche à hexagonale facilite la fusion avec la membrane de l'endosome et sa

déstabilisation (Felgner et al., 1994 ; Koltover et al., 1994 ; Zuidam et al., 1998). Ceci conduit alors à la libération de l'ADN dans le cytoplasme (Noguchi et al., 1998). DOPE peut aussi faciliter la dissociation des lipides et de l'ADN après la sortie du complexe de l'endosome. Ceci serait dû à l'interaction des groupements amines de la partie phosphatidylethanolamine, avec les groupements phosphate de l'ADN, fragilisant la liaison initiale avec le lipide cationique (Harvie et al., 1998 ; Simoes et al., 1999).

Le problème avec les formulations à base de DOPE est leur instabilité dans le plasma et le sérum (Connor et Huang, 1986), ce qui peut conduire à la libération prématurée de l'ADN.

Certains polymères pH-sensibles sont utilisés dans la conception des liposomes. Grâce à cette sensibilité aux variations du pH, ces polymères peuvent servir à procurer à la plupart des liposomes une activité pH-dépendante. Par exemple, les liposomes à base de EPC (egg phosphatidylcholine), modifiés par greffage d'acide poly(2-éthylacrylique) à leur surface, sont déstabilisés à pH 6.5 (Maeda et al., 1988). L'utilisation de dérivés à base de polyéthylène glycol (PEG) avec des groupements carboxyliques a aussi démontré une capacité à induire la fusion et la rupture des liposomes à pH 5.5 (Kono et al., 1994).

- Nanoparticules et nanocapsules

Les nanoparticules constituent la seconde génération des véhicules de médicaments sous forme particulaire. Elles ont été développées pour améliorer la biodisponibilité et permettre une libération contrôlée et un ciblage du site thérapeutique. Les nanoparticules se distinguent des nanocapsules par la présence du polymère dans la totalité de sa structure. Les nanocapsules contiennent la substance d'intérêt dans la partie centrale qui se trouve être entourée par le polymère. La petite taille des nanoparticules ($< 1 \mu\text{m}$) constitue un élément important dans la vectorisation d'ADN au niveau cellulaire où elles peuvent être internalisées par endocytose.

2.2. Propriétés requises pour un système optimal

Le système non viral idéal doit avoir les propriétés suivantes :

i) une structure bien caractérisée, non toxique, biodégradable, non antigénique, qui protège l'ADN de la dégradation et doit être stable dans les biofluides; ii) une incorporation dans la cellule médiée par des récepteurs membranaires spécifiques; iii) une libération rapide pH-dépendante à partir des endosomes; iv) une dissociation de l'ADN du complexe dans le cytoplasme pour le transport de l'ADN dans le noyau; v) une durée et une magnitude d'expression contrôlées. En se basant sur ce cahier des charges, plusieurs stratégies ont été développées pour améliorer la vectorisation de l'ADN (Elouahabi et Ruysschaert, 2005).

2.3. Stratégies pour améliorer la vectorisation d'ADN

Il est connu que les microorganismes qui envahissent le corps peuvent échapper à la destruction par les macrophages et restent en circulation pour des périodes plus longues, grâce à leurs propriétés de surface (Cabral et al., 1987). Plusieurs stratégies utilisées pour l'amélioration des particules colloïdales et l'augmentation de leur biodisponibilité s'en sont inspirées.

2.3.1. Polymères naturels

Les microorganismes pathogènes utilisent plusieurs stratégies de surface pour empêcher leur reconnaissance par les macrophages. À titre d'exemples, *Pseudomonas aeruginosa* (fibrose kystique) portent à leur surface l'acide pluronique polysaccharide qui interfère avec la phagocytose à cause de son hydrophilie (Cabral et al., 1987). L'enveloppe externe de glycoprotéines du virus HIV-1 est largement glycosylée. Ces carbohydrates forment une barrière pour aider à masquer le virus au système immunitaire et limitent l'accès aux anticorps (Reitter et al., 1998). Le constituant majeur des glycoprotéines de l'enveloppe

microbienne est l'acide sialique (Ram et al., 1998). Il permet la liaison du facteur H et de ce fait, la protection des microbes contre la destruction médiée par le complément (Meri et Pangburn, 1994).

Ces données ont ouvert un champ d'exploration dans la modification des nanoparticules. L'un des premiers essais a consisté à décorer les liposomes avec le dextrane pour prolonger leur présence dans la circulation. Il a alors été montré que le taux de persistance des liposomes est proportionnel à la densité du polymère sur la surface des liposomes (Pain et al., 1984). Le Pullulan (α -D-glucan), un exopolysaccharide bactérien, a aussi été utilisé pour la modification de surface des liposomes (Kang et al., 1997). Les mêmes stratégies pourraient être appliquées pour modifier les particules colloïdales en surface. Cependant, leur utilisation pourrait avoir des conséquences immunologiques, en plus du coût de production élevé. Ceci a donc mené à rediriger les efforts vers la conception de polymères synthétiques en vue de modifier la surface des nanoparticules.

2.3.2. Polymères synthétiques

En 1967, Geyer a montré que l'injection intraveineuse d'émulsion lipidique préparée avec le POE/POP (polyoxyéthylène/polyoxypropylène), demeurait dans la circulation pendant des périodes relativement élevées. Il s'agit de poloxamères avec un block POP central avec une chaîne de POE de chaque côté (figure 2.1).

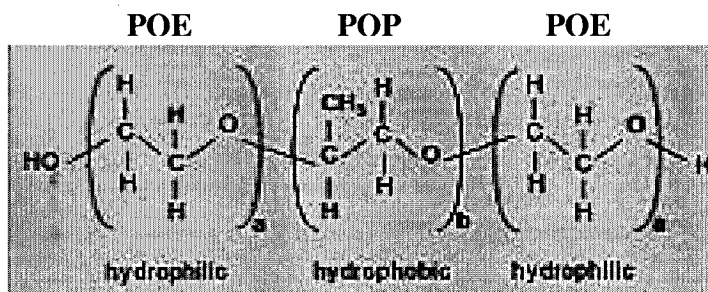


Figure 2.1 Structure chimique de poloxamères. En variant le nombre de a et b, différents poloxamères peuvent être obtenus.

Les surfactants PEO/POP de haut poids moléculaire préviennent l'adhérence des particules lipidiques à l'endothélium des vaisseaux sanguins tout en inhibant leur reconnaissance par les macrophages (Jeppsson et Rossner, 1975). Le POE/POP entre dans la composition de poloxamines qui sont des blocs tétrafonctionnels avec 4 POE/POP liés entre eux par une éthylène diamine centrale (Figure 2.2).

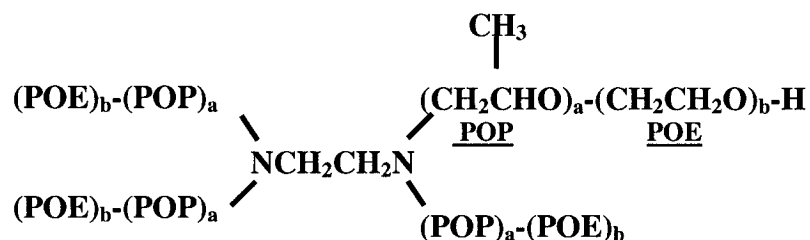


Figure 2.2 Structure des poloxamines

Pour fonctionner comme un surfactant, un composé doit inclure des entités hydrophiles (polaires) et hydrophobes (lipophiles, non polaires); c'est à dire qu'il doit être amphiphile. L'hydrophilie et hydrophobie relatives des composants non-ioniques amphiphiles est déterminée par la balance hydrophile-lipophile (valeur HLB). Les surfactants avec une faible valeur HLB sont hydrophobes et se dissolvant dans les

matières grasses alors que ceux avec une valeur HLB élevée sont hydrophiles et se dissolvent dans des solutions aqueuses.

Différentes études ont montré que les poloxamines et poloxamères s'adsorbent sur des surfaces hydrophobes grâce à leur composante hydrophobe (bloc central POP) laissant les bras POE dans un état mobile. Ces chaînes dépassent de la surface de la particule lui procurant ainsi une stabilité en suspension, suite à un effet de répulsion stérique impliquant les contributions enthalpiques et entropiques (Troster et al., 1990 ; Moghimi et al., 1993 ; Stolnik et al., 1994 ; Monfardini et Veronese, 1998). La force d'adsorption du polymère et la conformation qui en résulte dépend de la proportion des segments POP et POE ainsi que des propriétés physico-chimiques de surface de la nanoparticule (Moghimi et Hunter, 2000).

2.3.3. Pégylation

Elle consiste à greffer du polyéthylène glycol (PEG) sur les nanoparticules (Bazile et al., 1995). C'est un polyéther diol linéaire de formule chimique $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$. Il possède un degré d'immunogénicité et antigénicité très faible (Abuchowski et al., 1977). Le squelette du polymère est chimiquement inerte et les groupements hydroxyl terminaux sont disponibles pour la dérivation. Généralement, ils sont activés et mis à réagir avec une molécule déterminée. La modification de surface des nanoparticules avec le PEG et ses dérivés peut être accomplie par adsorption, incorporation durant la synthèse de nanoparticules ou attachement de façon covalente à la surface. Ceci va permettre de limiter l'interaction des nanoparticules avec les opsonines (diminution de la phagocytose) et augmenter leur temps de rétention dans le sang (Peracchia et al., 1997).

2.4. Nanovecteurs d'ADN et barrières cellulaires

Les composants cellulaires tels que le cytoplasme, l'endosome, le lysosome, le réticulum endoplasmique, le corps de Golgi, la mitochondrie et le noyau maintiennent leur propre valeur de pH qui varie de 4.5 dans le lysosome à 8 dans la mitochondrie. Ce gradient de pH intracellulaire peut être exploité en utilisant des composés dotés de pKa entre 5.0 et 8.0 et qui peuvent être utilisés lors de l'élaboration de systèmes pour véhiculer de l'ADN dans la cellule. Ces molécules peuvent avoir un effet sur la fusion membranaire, la formation de pores transitoires, ou la déstabilisation de la membrane (Asokan et Cho, 2002).

Véhiculer des gènes aux cellules et réussir à les faire exprimer est un défi où les barrières peuvent être divisées en 2 classes : systémiques et cellulaires.

La première classe est représentée par les barrières biologiques rencontrées lors d'une administration systémique de facteurs de transfection, du site d'administration jusqu'à l'organe/cellule-cible. Il s'agit notamment du sang, des protéines se trouvant dans le sérum (opsonines) et des autres éléments cellulaires tels que les macrophages qui se chargent d'éliminer les vecteurs avant d'arriver à destination, sans parler des interactions non spécifiques avec d'autres cellules et organes. Des solutions ont été proposées par différents chercheurs allant du ciblage cellulaire actif à l'utilisation de facteurs transcriptionnels bien précis (ex. promoteurs spécifiques des tissus ciblés) en passant par le masquage des groupements réactifs pour échapper au système phagocytaire.

Les barrières cellulaires à considérer lors de l'élaboration de nouveaux systèmes pour véhiculer de l'ADN dans les cellules (que ce soit pour inhiber la transcription de gènes/oligonucléotides anti-sens, ou faire exprimer une protéine d'intérêt suite à l'introduction d'un plasmide contenant un gène spécifique) sont les suivantes :

- la membrane cellulaire/plasmique qui représente la porte d'entrée du système dans la cellule;
- l'endosome;
- le noyau

Trois étapes majoritaires sont donc à considérer :

- Internalisation : entrée dans la cellule (endocytose, récepteurs membranaires etc.)
- Libération de l'ADN de l'endosome dans le cytosol avant sa fusion avec le lysosome.
- Passage de l'ADN du cytoplasme au noyau pour la transcription de l'ADN en ARN et ensuite, sa traduction en protéine par les ribosomes (figure 2.3).

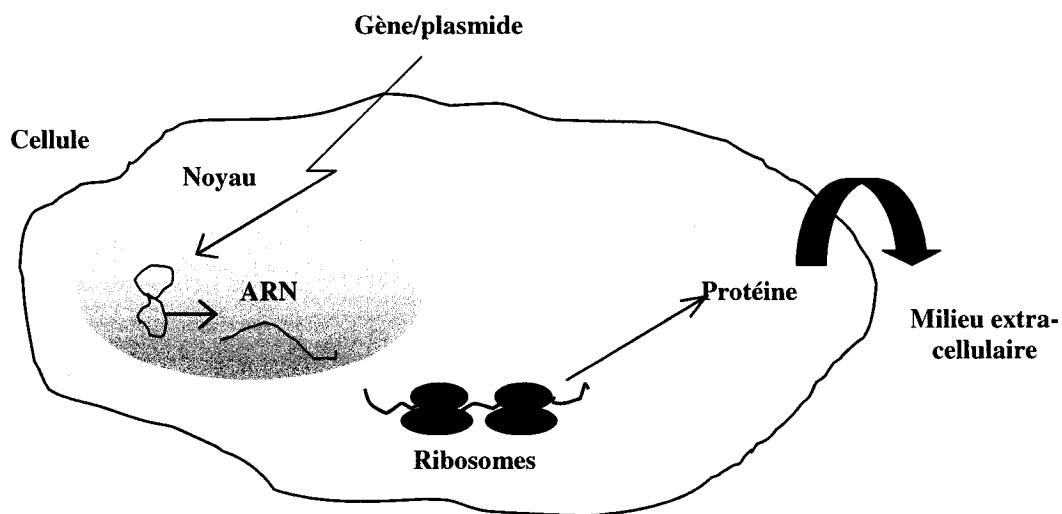


Figure 2.3 Représentation schématique du passage d'un plasmide dans une cellule et

expression de la protéine.

2.4.1 Membrane cellulaire et ciblage spécifique

Le ciblage spécifique des récepteurs membranaires des cellules figure parmi les stratégies développées pour favoriser l'internalisation des nanovecteurs.

Par exemple le récepteur aux asialoglycoprotéines fait partie du système de surveillance dans la circulation qui élimine les protéines vieillissantes par la perte spontanée de l'acide sialique (Spiess, 1990). Ce récepteur hautement spécifique a été utilisé par Wu et al. pour véhiculer des gènes au niveau du foie *in vivo* (1988 et 1989). Leur procédure expérimentale consistait à attacher, de façon covalente, un ligand pour le récepteur de l'asialoglycoprotéine (asialoorosomucoid (ASOR)) au niveau de la polylysine. D'autres exemples utilisant le transfert des gènes à médiation de récepteurs ont été rapportés tels que le récepteur à la transferrine (Wagner et al., 1990), l'insuline (Huckett et al., 1990 ; Rosenkranz et al., 1992), la thrombomoduline (Trubetskoy et al., 1992), le facteur de croissance épidermique (EGF) (Chen, 1994), les lectines (Batra et al., 1994 ; Yin et Cheng, 1994), le folate (Gottschalk et al., 1994), les intégrines (Hart et al., 1994), la mucine (Thurnher et al., 1994), les protéines surfactantes A et B (Baatz et al., 1994; Ross et al., 1995), l'immunoglobuline (Ferkol et al., 1995), le récepteur CD3 des cellules T (Buschle et al., 1995), l' α_2 -macroglobuline (Schneider et al., 1996), le mannose (Erbacher et al., 1996) et c-kit (Schwarzenberger, 1996).

La connaissance de la relation structure-fonction de plusieurs ligands rend possible l'obtention de ligands avec de hautes affinités de liaison (1-10 nM). La plupart des ligands sont des protéines dont la distribution de récepteurs spécifiques a été déterminée dans plusieurs tissus et organes. Les mécanismes et les routes d'internalisation des complexes ligand-récepteur ont été partiellement caractérisés *in vivo*, ce qui rend prédictible la biodistribution des complexes d'ADN, en autant qu'ils possèdent les caractéristiques biochimiques du ligand natif.

2.4.2 Endosome et lysosome

D'après "*The Dictionary of Cell and Molecular Biology*"(www.mblab.gla.ac.uk), l'endosome est une vésicule endocytaire formée à partir de la membrane plasmique. Plus spécifiquement, un compartiment acide non lysosomal dans lequel les complexes récepteur-ligand se dissocient.

Il constitue la deuxième étape dans le cheminement du matériel endocyté via la membrane plasmique. Il représente l'une des barrières intracellulaires majeures. En effet, le passage de l'ADN de l'endosome dans le cytoplasme sans dégradation dans le lysosome demeure un pré-requis pour son transport dans le noyau.

Une autre définition est donnée par "*A Dictionary of Biology, Oxford University Press, © Market House Books Ltd 2000*" qui pourrait être traduite comme suit : « une vésicule formée dans la cellule durant les formes d'endocytose dans laquelle le matériel à ingérer se lie d'abord aux récepteurs de la surface cellulaire. Ces récepteurs sont localisés dans des régions de la membrane plasmique appelées « coated pits » -littéralement, puits recouverts- qui se détachent pour former des vésicules recouvertes d'un enrobage de protéines (clathrine) et contenant le matériel extracellulaire dans l'espace intracellulaire. Ces vésicules se débarrassent alors de leur enrobage pour fusionner avec d'autres vésicules pour former les endosomes. Ces derniers fusionnent avec des vésicules de l'appareil de Golgi pour former les lysosomes (www.xrefer.com/entry/460832) ».

Le lysosome se distingue de l'endosome par l'absence des deux récepteurs au mannose-6-phosphate (mannose-phosphate receptor (MPR)). Organelle montré en microscopie électronique comme ayant un diamètre d'environ 0.5 μm (Holtzman, 1989), il est délimité par une membrane et contient des hydrolases acides incluant les phosphatases, protéases et nucléases transportées à partir du Golgi. Il est caractérisé par son environnement acide. En fusionnant avec l'endosome, il constitue l'« estomac

cellulaire », siège de digestion. C'est le compartiment final de la dégradation du matériel endocyté (Kornfeld et Mellman, 1989) qui joue un rôle important dans la destruction du matériel, après phagocytose (Funato, 1997). De ce fait, il est à prévoir que tout matériel susceptible d'être dégradé par les hydrolases du lysosome est voué à la destruction. C'est notamment le cas des protéines et de l'ADN utilisés en thérapies cellulaires pour suppléer à un dysfonctionnement ou une déficience. Pour que l'ADN véhiculé à la cellule assume sa fonction, il est essentiel de « court-circuiter » le lysosome en se libérant le plus rapidement de l'endosome. Le schéma idéal du cheminement de l'ADN à faire exprimer par la cellule est présenté dans la figure 2.4.

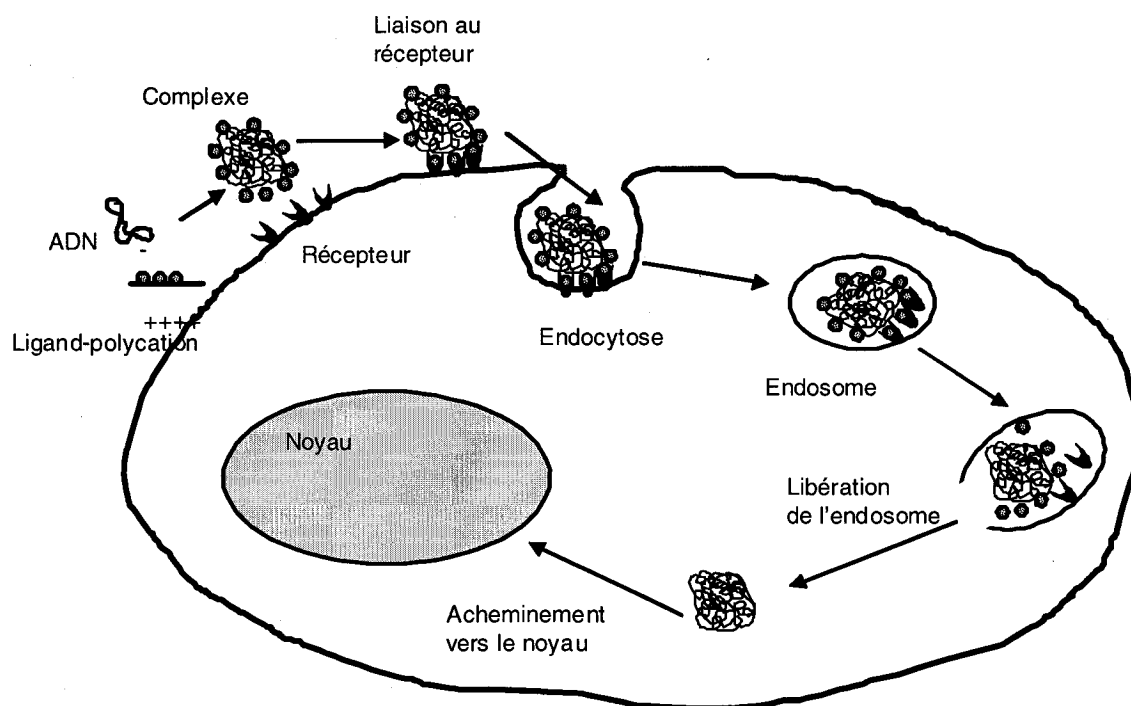


Figure 2.4 Cheminement des complexes du milieu extracellulaire vers le noyau, après liaison avec les récepteurs membranaires (adapté de Kircheis et al., 2001).

L'échec à se libérer de l'endosome conduit à la diminution de la disponibilité de l'ADN dans le noyau, ce qui au retour, diminue l'efficacité de transfert de gènes. C'est pour cela

que plusieurs stratégies sont développées pour contrecarrer ce problème, en utilisant des agents endolysosomotropiques, des polymères avec des propriétés dépendantes du pH, des domaines de transduction de protéines ou des peptides fusogéniques.

2.4.2.1. Agents endosomo et lysosomo-tropiques

D'après de Duve et al., le mot « lysosomotropique » désigne toute substance captée sélectivement par le lysosome indépendamment de sa structure chimique ou du mécanisme qui favorise sa capture (1974).

Ces agents sont utilisés en conjugaison avec les vecteurs plasmidiques et viraux et en combinaison avec les systèmes polymériques, pour augmenter l'efficacité de la vectorisation des gènes. Ces substances sont utilisées soit pour inactiver les enzymes lysosomales responsables de la dégradation de l'ADN, ou pour inhiber la fusion des endosomes avec les lysosomes.

Parmi ces agents nous pouvons citer :

- Chloroquine

Elle possède des capacités tampon prévenant l'acidification de l'endosome et contribuant à son gonflement et à son éclatement. De plus les enzymes lysosomales sont inactives à cause du pH inadéquat, ce qui contribue à protéger l'ADN de la dégradation et augmente le potentiel de transfection (Luthman et Magnusson, 1983 ; Wagner et al., 1992).

Cette approche est cependant limitée à des utilisations *in vitro*. Des études sur les doses efficaces *in vivo* demeurent à déterminer. La question reste posée sur les effets de l'utilisation de cette approche car la chloroquine est connue pour induire une baisse de la température corporelle et peu de données sont disponibles par rapport à sa toxicité (Lot, 1992).

- Saccharose

Les cellules des mammifères ne possèdent pas les enzymes disaccharidases nécessaires au métabolisme intracellulaire du saccharose (Levy et al., 1994). De ce fait, ce dernier provoque le gonflement des vésicules intracellulaires cytoplasmiques (endosomes et lysosomes) suite à un flux osmotique d'eau (Wildenthal et al., 1977 ; Kato et al., 1984 ; Legendre et Szoka, 1992). La présence simultanée d'ADN et de saccharose dans les lysosomes conduit à une diminution de la dégradation de l'ADN qui demeure disponible pour la transfection.

- Polyvinylpyrrolidone (PVP)

Il s'accumule dans les vésicules après son internalisation par pinocytose à cause de sa résistance à la destruction par les enzymes lysosomotropiques (Munniksma et al., 1980). Il provoque le gonflement des vésicules et empêche la fusion des lysosomes avec l'ADN internalisé et donc sa dégradation.

Simultanément, ces trois systèmes ont été étudiés comme agents lysosomotropiques dans un modèle de culture de fibroblastes *in vitro* par Ciftci et Levy (2001). Ils ont montré que le degré d'efficacité dépend de l'agent et la cellule. Ils conseillent, cependant, de faire attention à l'utilisation du PVP et de la chloroquine qui ont des effets cytotoxiques.

2.4.2.2. Les polymères

- Polyéthylèneimine (PEI)

Il possède une capacité endosomolytique intrinsèque. C'est un polymère hautement branché possédant des amines primaires, secondaires et tertiaires (figure 2.5). Lorsque le PEI est dissous dans l'eau, les groupements amines réagissent avec le solvant, pour former des groupements chargés positivement. Les groupements amines ne sont pas tous

protonés. L'addition d'acide augmente le nombre de groupements amines chargés faisant de lui une vraie éponge à protons. L'hypothèse avancée par Boussif et ses collaborateurs, concernant l'efficacité de transfection en utilisant ce système, est due aux capacités « tampon » du polymère (Boussif et al., 1995). Durant ce processus, le flux de protons et d'ions chlorure augmente, durant l'acidification du compartiment endolysosomal, conduisant à l'augmentation de la pression osmotique dans la vésicule. Comme conséquence, la diffusion passive d'eau vers l'intérieur du compartiment endolysosomal conduit à son gonflement et à sa rupture. Ce qui, finalement, conduit à la libération de l'ADN avant sa dégradation. De plus les capacités tampon du PEI conduisent à l'inactivation des enzymes lysosomales, suite à l'augmentation du pH.

La capture de protons par le PEI, durant le processus d'acidification de l'endosome a comme résultat l'expansion de la structure du polymère, suite à la répulsion des charges positives. Ceci va conduire à la déstabilisation de la membrane. La validité de cette hypothèse est mise en évidence par l'empêchement de l'acidification lysosomale en inhibant la pompe à proton par la bafilomycine A1 et la concanamycine A (Kichler et al., 2001). Il a été rapporté qu'une diminution de l'expression du gène est réduite de 7 à 74 fois, dépendamment de la lignée cellulaire utilisée (Kichler et al., 2001). Une autre étude, effectuée par Merdan et al. (2002), a montré une diminution de l'expression du gène marqueur de 200 fois après inhibition sélective de l'acidification du lysosome.

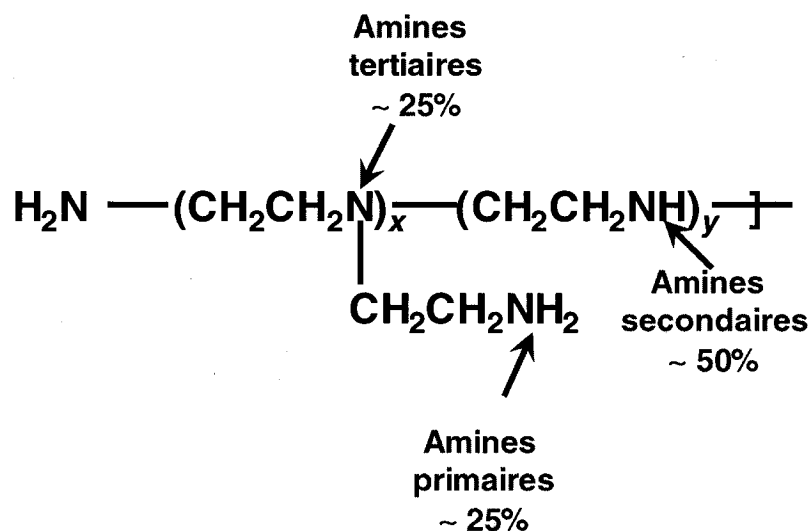


Figure 2.4 Structure du PEI

- Polylysine avec imidazole

Les polycations pH-sensibles tels que la polylysine (polysine-graft-imidazole acetic acid) sont utilisés pour créer un gradient osmotique conduisant à la rupture de l'endosome (Chen et al., 2005). Ils sont constitués de groupements amines (polylysine) qui permettent la condensation de l'ADN et de groupements imidazoles qui tamponnent l'endosome et augmentent la pression osmotique, d'où une pénétration d'eau qui fait éclater la membrane de l'endosome.

- Acide poly(propylacrylique) (PPAA)

Le PPAA (figure 2.6) est l'analogue de l'acide polyacrylique (PAA) qui est aussi un polyanion carboxylique. La différence est que ce dernier ne contient pas les groupements propyls répétitifs. Il a été démontré que l'augmentation du potentiel de transfection par le PPAA, en comparaison avec le PAA, est due essentiellement à cette différence qui confère au premier ses propriétés pH dépendantes (Cheung et al., 2001). Il est utilisé pour

sa capacité à déstabiliser la membrane à un pH inférieur à 6.5 et augmente la transfection. Il est aussi caractérisé par sa stabilité en présence de concentration élevée de sérum, qui peut aller jusqu'à 50% (Kyriakides et al., 2002).

Ce polymère polyanionique est, entre autres, utilisé pour augmenter la stabilité des lipoplexes cationiques (Cheung et al., 2005).

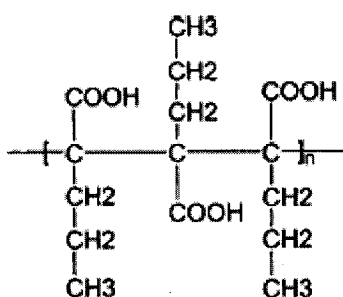


Figure 2.5 Structure chimique du PPAA.

- Acide Poly(2-éthacrylique) (PEAA)

Dépendamment de leur état d'ionisation, les polyanions tels que le PEAA peuvent déstabiliser la membrane de phospholipides. Suite à la protonation des groupements carboxyliques, le PEAA passe d'une forme enroulée à une forme de globule et cause la déstabilisation membranaire (Thomas et Tirrell 1992).

- N-isopropylacrylamide (NIPAM)

Il est utilisé pour conférer une sensibilité dépendante du pH aux liposomes (Meyer et al., 1998). Le NIPAM collapse à une température supérieure à 32°C en solution aqueuse. L'addition d'entités ionisables peut augmenter sa température de solution critique (lower critical solution temperature ; LCST) au-delà de 37°C et rendre le polymère sensible au

pH. Le NIPAM contenant de l'acide méthacrylique permet la libération du contenu des liposomes dans des conditions acides (Meyer et al., 1998 ; Zignani et al., 2000).

2.4.2.3 Domaines de transduction de protéines (protein transduction domain : PTD)

Les PTD favorisent une voie d'entrée dans la cellule indépendante de l'endocytose. Elles arrivent à cheminer à travers la membrane cellulaire après sa perméabilisation et ont la fonction de transport intercellulaire (Elliott et O'Hare, 1997). Leur avantage réside dans l'évitement du système endolysosomal. Plusieurs séquences ont été identifiées comme ayant des capacités de transduction. C'est le cas de la protéine TAT, dérivée du virus HIV-1 (Frankel et Pabo, 1988), du facteur de transcription de *Drosophila antennapedia* (ANTP) (Joliot et al., 1991) et du VP22 du virus herpes simplex type-1 (Elliott et O'Hare, 1997).

Une augmentation de l'expression du gène d'ordre 10 a été démontrée en utilisant des complexes ternaires PEI-plasmide-TAT en comparaison avec les complexes sans la séquence TAT (Rudolph et al., 2000). Son attachement à la surface des liposomes a permis leur localisation dans le cytosol. L'attachement du PEG, comme agent de liaison, a permis une diminution des interactions stériques et une augmentation de la transcription du gène (Torchilin et al., 2001).

Des oligonucléotides antisens ont été couplés au peptide ANTP et ont montré une inhibition de la synthèse de l'APP (amyloid precursor protein) et ce, à des quantités bien inférieures à celles communément utilisées (40 et 200 nM) (Allinquant et al., 1995).

Les PTD se distinguent par une composition riche en acides aminés basiques tels que l'arginine et la lysine (Tableau 2.1). Ceci joue un rôle dans leur interaction avec les constituants négativement chargés de la membrane. Cependant, cela constitue aussi une limitation majeure pour leur utilisation comme véhicule d'ADN. Les interactions

électrostatiques conduisent à un changement conformationnel des peptides, induisant une baisse de sa capacité de transduction. L'excès de charges positives conduit aussi à la non spécificité des interactions avec les cellules et les composants biologiques. Par exemple TAT a été révélée à plus de 10^7 sites par cellule et localisée dans le cytoplasme et le noyau (car elle contient en plus, une séquence de localisation nucléaire) (Mann et Frankel, 1991). Son utilisation sur plusieurs types cellulaires a montré une augmentation de leur transfection (Tung et al., 2002).

Pour des utilisations spécifiques, il faudrait attacher des entités déterminées qui permettent de cibler un tissu ou un organe particulier.

Tableau 2.1 Séquences des PTD les plus fréquemment utilisées (Merdan et al., 2002).

HIV-1 TAT	YGRKKRRQRRR
HSV VP22	DAATATRGRSAASRPTEPRAPARSASRPVRPVE
ANTP	RQIKIWFQNRRMKWKK

2.4.2.4 Les polymères Adénovirus/Peptides fusogéniques

L'attachement des adénovirus inactivés aux complexes polymère/ADN est une autre approche utilisée. Elle consiste à incuber les cellules avec des particules adénovirales et les complexes. Cette approche est difficilement applicable *in vivo* à cause des réactions inflammatoires engendrées par les adénovirus. De plus, il a été démontré que le potentiel de transfection est bien plus bas que dans les modèles *in vitro* (Patil et al., 2005). Une alternative à l'utilisation des particules virales réside dans l'utilisation des peptides fusogéniques. Plusieurs virus utilisent des protéines impliquées dans la déstabilisation de la membrane pour se libérer de l'endosome.

L'utilisation des peptides fusogéniques s'inscrit dans une optique de mimer le processus par lequel les virus sont capables de déstabiliser la membrane endosomale et d'infecter les cellules de façon efficace. L'un des systèmes les plus étudiés est l'héماغlutinine du virus de l'influenza. Le domaine de fusion de cette protéine est localisé au niveau N-terminal de la sous-unité HA 2 et a montré une efficacité de transfection élevée dans bon nombre de modèles (Plank et al., 1994 ; Nishikawa et al., 2000).

Lee et al. (2002) ont développé un système à base de poly (L-lysine) sur lequel a été greffé le PEG qui est ensuite complexé à l'ADN. Le peptide fusogénique KALA (chargé positivement) est ajouté pour enrober les nanoparticules (charge négative), suite à une interaction ionique. Le système final obtenu exhibe une charge nette positive. La transfection est augmentée en fonction de la quantité du lipide fusogénique utilisée (Lee et al., 2002).

2.4.3 Le noyau

La libération de l'ADN dans le cytosol de la cellule cible ne représente pas la phase finale dans le processus du transfert de gènes. Le problème de l'instabilité de l'ADN après sa sortie de l'endosome reste critique car l'ADN demeure sujet à la dégradation par les nucléases du cytosol (Lechardeur et al., 1999). La dernière étape-barrière réside dans le passage de l'ADN du cytosol au noyau où il va être transcrit. Des études ont montré que seulement $1/10^4$ - 10^5 plasmides pris par la cellule sont exprimés (Tseng et al., 1997; Capecchi et al., 2000).

L'ADN plasmidique non protégé possède une demi-vie allant de 50 à 90 minutes (Page et al., 1995). Sa mobilité dans le cytosol est réduite proportionnellement à sa taille (Lukacs et al., 2000). Plusieurs facteurs en sont responsables tel que la viscosité du cytosol et la structure du cytosquelette, de même que les interactions de l'ADN, négativement chargé, avec les constituants intracellulaires. Plus l'ADN est libéré loin du noyau plus il est

susceptible à voir une réduction de son expression. Ceci a été confirmé par des études de micro-injection de plasmides qui restent localisés au site d'injection (Dowty et al., 1995).

Le noyau est entouré d'une double membrane (enveloppe nucléaire) interrompue par de larges structures protéiques (complexes de pores nucléaires ou CPN). Les CPN sont constitués de protéines d'environ 120.000 kDa et contiennent 50-100 protéines fonctionnellement distinctes, les nucléoporines qui sont impliquées dans le processus de transport et de structure (Vasu et Forbes 2001 ; Matsuoka et al., 1999).

Le passage des plasmides dans le noyau se fait différemment pour les cellules qui se divisent et celles qui ne se divisent pas. Dans le premier cas, les grosses molécules peuvent y pénétrer suite à la cassure de la membrane nucléaire. Dans le deuxième cas, les pores nucléaires peuvent être exploités pour la pénétration des plasmides. Cette pénétration dépend de la taille des plasmides, car les pores nucléaires ont un diamètre d'environ 26 nm (Cokol et al., 2000). En effet, des études ont montré que des fragments d'ADN linéaire, supérieurs à 1-1.5 kb, exhibent une diminution significative de leur transport dans le noyau (Ludtke et al., 1999; Kreiss et al., 1999).

Par ailleurs, de larges molécules telles que les protéines et les ARNs sont capables de rentrer et de sortir du noyau. Pour ce faire, elles sont reconnues par des séquences spécifiques ou séquences de localisation nucléaire (NLS) qui leur permettent d'y entrer et les signaux d'export nucléaire (SEN) pour en sortir. Sous des conditions physiologiques, l'ADN ne rentre pas dans le noyau et donc n'interagit pas avec les CPN (Salman et al., 2001).

Les molécules qui passent à travers le CPN peuvent avoir, ou non, des affinités pour ses composants. Le passage des molécules sans affinité se fait par diffusion passive, dépendamment de leur taille et de leurs propriétés stériques (Paine et al., 1975 ; Peters, 1986). La taille limite de ces molécules est de 50 kDa, ce qui correspond à un diamètre de

10 nm (Talcott et Moore, 1999). Des molécules plus larges sont capables d'entrer dans le noyau à condition d'interagir spécifiquement avec les composants du CPN.

Zabner et al. (1995), ont montré que la micro-injection de plasmide libre dans le noyau a résulté dans l'expression du gène, contrairement au plasmide sous forme complexée. C'est pour cela qu'il est nécessaire que l'ADN se libère juste à l'interface de la membrane nucléaire.

Ci-dessous sont exposées les différentes stratégies utilisées pour acheminer les plasmides au noyau.

2.4.3.1 Signal de localisation nucléaire (SLN)

Toutes les protéines synthétisées dans le cytoplasme et toutes celles qui sont requises au niveau du noyau doivent être acheminées du cytoplasme au noyau via les pores nucléaires. Ces protéines possèdent de courtes séquences peptidiques (SLN) qui permettent leur transport sélectif dans le noyau. Suite à la synthèse des protéines nucléaires dans le cytoplasme, celles-ci se lient aux importines qui, fixées au SLN se chargent de les acheminer dans le noyau à travers les pores nucléaires de façon active, via le cycle Ran GTPase (figure 2.7). À date, c'est le seul mécanisme de transport nucléaire exploité pour augmenter l'efficacité de transfection par des systèmes non viraux (Mattaj et al., 1998; Weis, 1998).

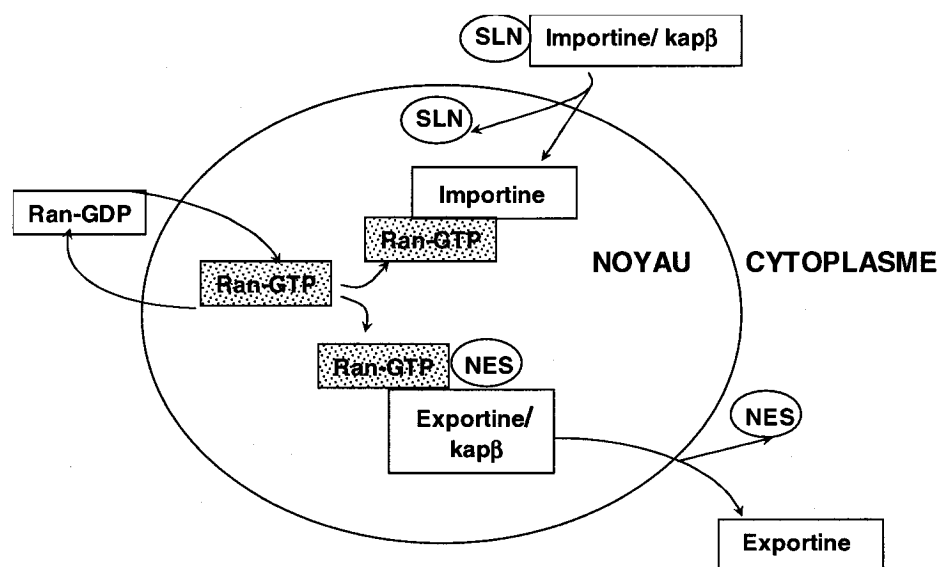


Figure 2.6 Schéma simplifié de l'import nucléaire (adapté de dargemont, 2002).

Une des études récentes, effectuée par Nagasaki et al. (2005), a consisté à conjuguer un plasmide codant pour la GFP (green fluorescent protein) à l'importine- β et à l'introduire par micro-injection dans le cytoplasme des cellules NIH3T3. Les résultats ont montré une localisation du plasmide au niveau du noyau, avec un très haut taux d'expression du gène, en comparaison avec le plasmide non conjugué.

Pour faire acheminer l'ADN au niveau du noyau, il est nécessaire d'intégrer dans le système, des séquences de ciblage du noyau ou des SLN (Chan et Jans 1999). Il est possible que l'attachement de ces séquences aux complexes polymère/ADN ait comme résultat, une meilleure efficacité de transfection. Plusieurs candidats ont été rapportés et beaucoup d'entre eux contiennent des motifs lysine et arginine (Dingwall et Laskey, 1991).

2.4.3.2 Antigène T du SV40

Le SLN de l'antigène T de SV40 a été l'un des premiers à être découvert et possède la séquence d'acides aminés PKKKRKV (Rihs et al., 1991). Son utilisation, après couplage aux plasmides, a montré une augmentation de leur localisation nucléaire (Liang et al., 2000). En attachant une séquence de localisation nucléaire de l'antigène-T du virus SV40 par molécule d'ADN, Zanta et al. (1999) ont démontré une augmentation de la transfection de 1000 fois. Cependant, l'efficacité de l'internalisation de ces systèmes reste tributaire de la taille de l'ADN (Ludtke et al., 1999).

2.4.3.3 Histones

Les histones ont pour fonction principale de réguler la condensation de l'ADN, permettant son passage d'une structure ouverte, l'euchromatine, à une structure fermée, condensée inaccessible aux ARN polymérases -qui permettent la transcription d'une molécule d'ADN en ARN-, l'hétérochromatine. Cette propriété est exploitée en développant une autre approche pour faire cheminer l'ADN vers le noyau. Elle consiste à utiliser des histones qui contiennent une séquence de localisation nucléaire et qui jouent un rôle dans la condensation de l'ADN et son transport dans le noyau (Balicki et al., 2002).

2.4.3.4 Séquence TAT

La séquence TAT du HIV-1 contient aussi un SLN et a été utilisée dans la fabrication de complexes avec le PEI. Une augmentation de l'ordre de 10 fois dans l'expression du gène a été démontrée, après administration intra-trachéale aux poumons de souris (Rudolph et al., 2000).

L'attachement de SLN aux vecteurs d'ADN peut se faire de façon covalente ou non. Dans ce dernier cas, il est basé sur l'interaction électrostatique de l'ADN et des séquences de localisation nucléaire. L'attachement covalent de l'ADN à des séquences de

localisation nucléaire permet d'obtenir des conjugués stables et conduire à une meilleure transfection.

2.5 Aspects physico-chimiques

Pour des applications *in vivo*, les paramètres physiques et colloïdaux des complexes utilisés pour la transfection tels que la taille, la stabilité et la charge de surface sont des facteurs critiques qui déterminent la biodistribution de l'ADN et l'expression des gènes. La connaissance de ces paramètres et leur interaction complexe permettront de constituer une base pour un développement rationnel des systèmes de libération de gènes pour des applications *in vivo*.

2.5.1 Interaction entre le polymère et l'ADN pour former les nanoparticules

Lorsque deux solutions aqueuses de polycations et polyanions sont mélangées, il se produit une interaction spontanée pour former un complexe (coacervat). Les complexes produits sont appelés polyélectrolytes (PECs) (Kabanov et Kabanov, 1995). L'interaction et l'assemblage spontané (complexation) sont causés par des liens électrostatiques coopératifs.

La formation des complexes à base de PECs est influencée par :

- la structure des polyélectrolytes ;
- les conditions dans lesquelles ils sont formés ;
- les solvants

Les propriétés des complexes ADN-polycation varient grandement entre différentes préparations non seulement en utilisant des polymères différents, mais aussi avec :

- Le rapport de concentration des composants
- Les conditions sous lesquels ils sont formés.

Il est donc très important de définir les complexes optimaux et les conditions de manufacture et leur composition exacte pour produire des systèmes effectifs de transport d'ADN.

Par exemple, la complexation est affectée par la concentration en sels. À faible concentration saline, il se produit une répulsion entre les groupements ioniques dans les polyélectrolytes, donnant lieu à des coacervats beaucoup moins compacts. De plus, la capacité de réarrangement du complexe ainsi que la capacité d'échange entre le polyélectrolyte soluble et celui dans le coacervat sont grandement réduites à cause de la diminution des réactions d'échange. Au fur et à mesure que la concentration en sel augmente, il se produit une compétition avec la liaison de polyélectrolytes, réduisant ainsi l'interaction polyélectrolyte-polyélectrolyte à un certain niveau. Ceci rend le réarrangement plus facile entre les liens sel et polyélectrolytes. Ceci permet alors la compaction du complexe et donc des liens plus étroits. Si la concentration est plus élevée (0.3-1 M), le sel entre en compétition, assez fortement, pour affaiblir les liens entre les polyélectrolytes et conduits à la formation de PECs plus petits et plus solubles (Garnett, 1999).

2.5.2 Aspects physico-chimiques des nanoparticules en solution

Les paramètres les plus importants sont :

- Taille et distribution de taille des nanoparticules
- Charge de surface
- pH
- Hydrophilie/hydrophobie de surface

Ces propriétés affectent non seulement, la libération de l'ADN mais aussi les interactions avec les systèmes biologiques (liaison membranaire, internalisation).

Des particules de petite taille (moins de 100 nm), faible charge et surface hydrophile réussissent à échapper au système phagocytaire.

2.5.3 Taille et distribution des nanoparticules

En se basant sur leurs expériences, Wagner et al., (1991) ont avancé que la taille idéale des nanoparticules à base d'ADN doit être inférieure à 100 nm, pour obtenir un taux de transfection optimal. De ce fait, il apparaît qu'il est important de contrôler ce paramètre qui dépend des techniques de préparation. En général, la nature et la concentration de surfactant jouent un rôle important.

L'interaction entre les polymères cationiques et l'ADN se fait de façon électrostatique (Bloomfield, 1996). Ceci a été démontré par la relation linéaire qui existe entre la baisse de liaison et l'augmentation de la force ionique dans la solution (Tang et Szoka, 1997).

Le poids moléculaire du polymère utilisé peut affecter la taille des nanoparticules. Ceci a été notamment démontré pour la polylysine de 224 000 daltons qui forme des complexes variant de 100 à 300 nm avec l'ADN. Quand la PLL utilisée est plus courte (3970 daltons), les particules formées ont une taille de 20 à 30 nm (Wolfert et Seymour 1996).

2.5.4 Charge de surface

Bien que les polymères cationiques diffèrent dans leur capacité de transfection, ce qui différencie les polymères n'est pas leur comportement de liaison avec l'ADN ni leur morphologie de base après complexation avec l'ADN. Les différences sont observées dans la tendance des complexes à s'agréger. Ceux qui exhibent une bonne efficacité de transfection ont moins tendance à former des agrégats (Tang et Szoka, 1997). La formation d'agrégats est en grande partie due à l'instabilité des particules en solution qui est liée à la charge des nanoparticules.

La charge de surface peut être déterminée en mesurant le potentiel zeta (ζ) par « laser Doppler anemometry » (LDA). Le potentiel ζ d'une particule est la charge électrostatique globale qu'elle acquiert dans un milieu spécifique. C'est un potentiel électrocinétique décrivant l'état de charge de surface à l'interface solide/liquide. Un potentiel ζ élevé correspond à une charge de surface élevée et atteste d'une répulsion électrostatique entre les particules et donc, de l'augmentation de la stabilité contre l'agrégation.

Si toutes les particules ont des hautes charges positives ou négatives, elles vont se repousser et assurer la stabilité de la dispersion. Si les valeurs sont basses, il n'y a pas assez de force pour prévenir le rapprochement des particules les unes des autres, ce qui conduit à l'instabilité de la dispersion. La valeur qui sépare un système stable d'un système instable se situe soit à +30 ou -30mV.

Le changement dans le potentiel ζ en fonction du rapport des charges a été étudié pour plusieurs complexes à base d'ADN et polycations (Wolfert et al., 1996; Ramsey et al., 2000; Oupicky et al., 2000; Munier et al., 2005). En général, la valeur augmente de négative pour l'ADN libre, à positive en excès de cations. Elle se situe autour de zéro quand le rapport de charges entre le polymère (charge positive) et l'ADN (charge négative) est proche de 1.

En plus d'être relié à la stabilité du système colloïdal, le potentiel ζ affecte les interactions avec le système biologique (membrane cellulaire, protéines). C'est un facteur responsable de la modulation de la pharmacocinétique des nanoparticules et leur internalisation par les cellules.

Ainsi, la charge de surface a un effet sur la biodistribution et l'élimination des nanoparticules et liposomes. Quoique controversées, des études ont démontré que les systèmes qui possèdent une charge positive ou neutre sont moins rapidement éliminés que ceux qui sont chargés négativement (Wilkins et Myers, 1966; Stamp et Juliano 1975).

La charge de surface a aussi un effet sur la phagocytose. Il a été démontré qu'une charge hautement positive ou négative augmente la phagocytose des particules par rapport à celles qui ont une charge faiblement négative (Stossel et al., 1972). Par ailleurs, une étude conduite par Tabata et Ikada (1988) et ayant comme objectif de comparer l'effet d'une surface anionique à une surface cationique a montré que des particules d'un potentiel ζ de même valeur absolue n'ont pas montré de différence dans le taux de phagocytose.

2.5.5 Influence du pH sur le potentiel Zeta

Le pH est le facteur le plus important qui peut affecter le potentiel ζ . Imaginons une particule en suspension, avec un potentiel ζ négatif. Si un milieu alcalin est ajouté à la suspension, les particules ont tendance à acquérir une charge plus négative. Si un acide est ajouté, un point de neutralisation de la charge est atteint. Plus l'acide est ajouté, plus les charges redeviennent positives.

En général, une courbe de potentiel ζ versus le pH est positive à pH bas et inférieure ou négative à pH élevé. Il existe un point où la courbe passe par le point zéro de potentiel ζ . Ce point est appelé « point isoélectrique ». C'est le point où le système colloïdal est le moins stable (figure 2.8). Dans cette figure, il peut être observé que si le pH de la dispersion est inférieur à 4 ou supérieur à 8, il y a suffisamment de charges pour conférer une stabilité au système. Par contre, si le pH est compris entre 4 et 8, la dispersion peut être instable.

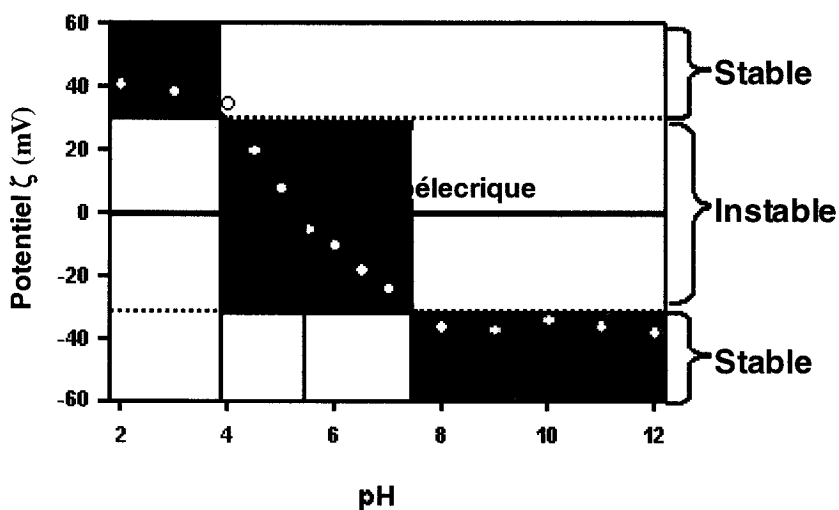


Figure 2.7 Effet du pH sur le potentiel Zeta
(adapté de <http://www.malvern.co.uk/home.htm>).

2.5.6 Hydrophobie/hydrophilie

L'hydrophobie de surface des particules est étroitement liée à leur phagocytose. En utilisant des poloxamères et poloxamines pour modifier la surface de particules, le potentiel phagocytaire relatif décroît en augmentant la longueur des chaînes hydrophiles qui contribuent à la stabilisation stérique (Illum et al., 1987).

2.5.7 Caractérisation physico-chimique des nanoparticules

Le tableau 2.2 montre les méthodes les plus couramment utilisées pour la caractérisation des nanoparticules.

Tableau 2.2 Méthodes utilisées pour la caractérisation physico-chimique des nanoparticules.

Paramètre	Méthode (exemples)
Taille	*Spectroscopie à corrélation photonique *TEM *SEM
Poids moléculaire	*Chromatographie sur gel
Densité	Pycnométrie à compression par Hélium
Crystallinité	DSC, Diffraction par rayons X
Charge de surface	Électrophorèse
Hydrophobie	Chromatographie d'interaction hydrophobe, angle de contact
Propriétés de surface	Spectroscopie de masse secondaire d'ions secondaires statique (SSIMS)
Analyse des éléments de surface	ESCA (x-ray photoelectron spectroscopy for chemical analysis)

2.6 Biocompatibilité des systèmes non viraux utilisés pour véhiculer l'ADN

La biocompatibilité cellulaire des systèmes utilisés comme véhicules d'ADN doit être évaluée à cause des effets indésirables que la toxicité peut provoquer. De plus, un dommage cellulaire précipité par un système cytotoxique peut grandement compromettre l'efficacité de transfection. En effet, la cellule doit maintenir sa capacité à transcrire et à traduire l'ADN.

Les données sur la toxicité des systèmes polycationiques ont montré que la plupart des polymères sont efficaces aux concentrations juste « subtoxiques ». Cependant, des informations systématiques sur tous les polycations utilisés en thérapie génique ne sont pas disponibles. Ce qui est connu est le fait que l'entrée des complexes dans la cellule est médiée par la déstabilisation de la membrane due aux effets polycationiques des polymères. Les effets cytotoxiques pourraient être dus, en partie, à la perturbation de la membrane phospholipidique provoquant un déséquilibre au niveau intracellulaire (Bashford et al., 1986).

Les systèmes cationiques actuels font face à des problèmes de toxicité qui sont intrinsèques à leur nature et attribuables à leur interaction avec les molécules chargées négativement. La cytotoxicité de polycations tels que la polylysine (PLL) et le PEI a été étudiée et corrélée avec les dommages membranaires évalués par la technique LDH (lactate déshydrogénase) (Choksakulnimitr et al., 1995; Fischer et al., 1999). Cet effet dépend du temps, de la dose, de la masse moléculaire et de la structure chimique. Un polycation de haute masse moléculaire possède un plus grand effet de déstabilisation membranaire. Il se trouve que ce sont ceux là qui induisent une meilleure efficacité de transfection. Il faudrait donc faire un compromis entre les effets cytotoxiques et l'efficacité de transfection.

La complexation avec l'ADN peut réduire à un certain niveau l'endommagement de la membrane à cause de la neutralisation des charges. Une autre alternative est la conjugaison de polymère hydrophile avec le complexe polycation/ADN qui pourrait réduire l'interaction avec la membrane cellulaire. Un des polymères utilisés est le polyéthylène glycol (PEG) qui réduit l'agrégation des érythrocytes responsable d'embolie au niveau pulmonaire (Ogris et al., 1999). Par ailleurs, les polycations non dégradables s'accumulent dans le noyau où ils interagissent avec l'ADN des cellules hôtes (Godbey et al., 1999), ce qui peut entraîner une toxicité à long terme. Pour éviter ce problème, des polycations hydrolysables dans le milieu aqueux en produits de bas poids moléculaire, non toxiques, sont utilisés comme alternative (Lim et al., 2000; Lynn et Langer, 2000).

Une autre étude a montré que les complexes polycationiques peuvent activer le complément, à cause de leur charge positive (Plank et al., 1996). Dans le cas de la PLL, elle croît en augmentant la longueur des chaînes. L'activation du complément est aussi proportionnelle au ratio de charge des complexes.

La biocompatibilité des différents polycations dépend de plusieurs paramètres (Moreau et al., 2002) :

- la nature chimique (modifiés ou non)
- le poids moléculaire
- la concentration
- les conditions expérimentales (présence de sérum ou non)

La diversité des structures et la facilité de contrôler les propriétés des vecteurs synthétiques peuvent conduire au développement de véhicules ayant une biocompatibilité satisfaisante.

Ici, quelques exemples sont donnés sur les systèmes les plus communément utilisés.

2.6.1 Polylysine (PLL)

L'effet cytotoxique de la PLL dépend de son poids moléculaire. En absence de sérum, uniquement la PLL de faible poids moléculaire (4 kDa) est relativement non toxique (80% de viabilité cellulaire à 20 µg/mL). La toxicité augmente avec le poids moléculaire (Wolfert et Seymour 1999). À faibles doses, la PLL induit une libération de prostaglandines qui est réversible. En augmentant la dose, les cellules ne récupèrent pas. Des études ont montré que la PLL induit une aggrégation des érythrocytes ainsi que des changements morphologiques au niveau cellulaire (Coakley et al., 1985). Par la suite, une étude effectuée par Gottschalk et al. (1996) a montré que la toxicité est observée même à des doses nanomolaires pour certaines PLL. L'activation du complément est liée à la charge positive des complexes polycationiques. Dans le cas de la PLL, elle croît en augmentant la longueur des chaînes et le ratio de charge.

2.6.2 Poly(cyanoacrylate)

Les nanoparticules à base de poly(cyanoacrylate) ont montré une faible cytotoxicité. Elles ont été utilisées sur plusieurs types cellulaires dont les fibroblastes (Gipps et al., 1987 ; Guise et al., 1987 ; Lherm et al., 1992), les cellules endothéliales (Lenaerts et al., 1984), les hépatocytes et les macrophages (Kante et al., 1982). Les résultats ont montré que la toxicité diminue, en augmentant la longueur des chaînes d'ester latérales (exception faite pour l'ester de méthyle) (Gipps et al., 1987; Lherm et al., 1992). Les produits de dégradation sont impliqués dans la toxicité car il a été montré que les nanoparticules non dégradées sont moins toxiques (Kreuter et al., 1984). Par ailleurs, il a été démontré que l'effet toxique des nanoparticules dépend de la concentration, après des durées aussi courtes que 2 heures, chez les hépatocytes (Kante et al., 1982).

En plus de la toxicité cellulaire, la mutagénicité des nanoparticules de poly(alkyl cyanoacrylate) a été évaluée. Dans ce cas, ni les nanoparticules ni leurs produits de dégradation n'ont montré de génotoxicité (Lherm et al., 1992). L'administration sous-

cutanée chez la souris n'a montré aucun signe de nécrose ou d'irritation tissulaire après 24 heures (Couvreur et al., 1986). Cependant, cette durée est trop courte pour rendre compte des effets réels de ces nanoparticules.

2.6.3 Chitosane

La condensation de l'ADN avec le chitosane a conduit à l'obtention de nanoparticules sans effet cytotoxique (Gosule et al., 1978; Corsi et al., 2002). Il faut cependant signaler, que l'efficacité des systèmes à base de chitosane seul (sans modification) est plus faible.

Un schéma général de la cytotoxicité, suite à l'utilisation de différents systèmes et méthodes pour la transfection cellulaire, en fonction de l'efficacité est présenté dans la figure 2.9. Cette dernière montre qu'il existe une corrélation entre l'efficacité de transfection et la toxicité; l'efficacité de transfection étant proportionnelle à la toxicité induite.

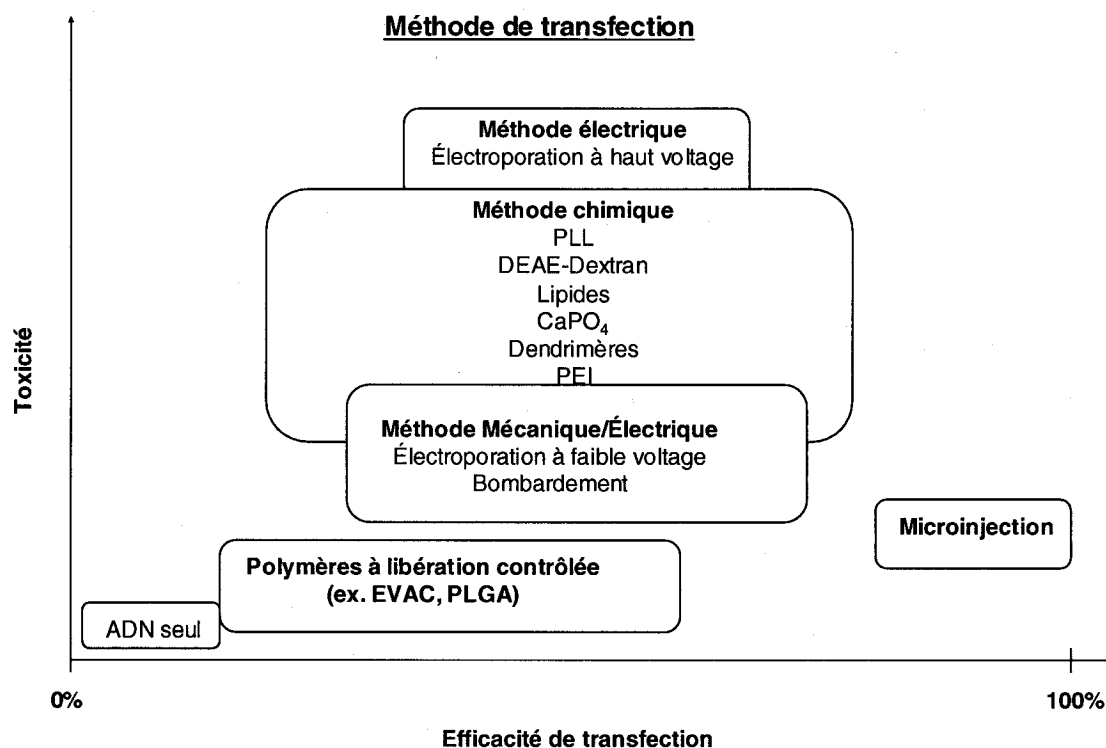


Figure 2.8 Comparaison entre l'efficacité de vectorisation et la toxicité des différentes méthodes de transfection (adapté de Luo et Saltzman, 2000). Il apparaît que plus la technique ou l'agent de transfection est efficace, plus la toxicité est élevée, sauf dans le cas de la technique de microinjection.

2.7 Les macrophages comme cible thérapeutique

Cette section traite de l'intérêt porté aux macrophages comme cible thérapeutique étant donné leur implication dans le développement de certaines maladies.

Le chapitre 3 constitué d'un article de revue de littérature traite de l'utilisation des systèmes nanoparticulaires pour diverses maladies médiées par les macrophages; cette section est un complément de la littérature justifiant l'utilisation des macrophages et leur ciblage.

Les macrophages sont largement distribués et placés de façon stratégique dans différents tissus du corps humain. Leur rôle consiste à reconnaître et à détruire des cellules altérées ou mourantes ou des substances envahissantes étrangères. Ils jouent un rôle déterminant dans la défense contre les agents infectieux tels que les bactéries, les virus, les protozoaires et les parasites.

Les macrophages peuvent sécréter une variété de substances dont l'action peut aller de l'induction de la prolifération à la mort cellulaire. Ces substances incluent les molécules de signal telle que le monoxyde d'azote (NO), les cytokines et les intermédiaires réactifs de l'oxygène (ROI) qui sont impliqués dans la défense contre les microorganismes pathogènes, les parasites et les cellules tumorales. Cependant, les NO et ROI sont responsables de l'activation de plusieurs voies dont certaines peuvent exercer un effet autotoxique sur les macrophages.

Les fonctions hétérogènes des macrophages dans le système immunitaire humain fait de ces cellules une cible intéressante à explorer pour véhiculer des médicaments. À date, les systèmes le plus utilisés restent les liposomes et les microsphères. Les vecteurs polymériques comme les nanoparticules ont été utilisés pour véhiculer, de façon contrôlée, des agents thérapeutiques à des organes spécifiques. Il a été démontré que les

macrophages sont impliqués dans leur élimination à partir de la circulation. Les macrophages constituent donc, une cible passive au sein de laquelle des agents immunomodulateurs peuvent être acheminés.

Cette capacité à ingérer des particules étrangères constitue une opportunité à explorer dans le cadre de l'administration d'agents thérapeutiques à ces cellules par voie parentérale. Les nanoparticules et les liposomes sont des vecteurs qui peuvent contribuer à l'acheminement de ces agents dans les cellules.

Le recrutement des macrophages et leur activation sont des événements impliqués dans le développement de différentes lésions pathologiques (tumeurs malignes, plaques d'athérosclérose, arthrite). L'utilisation des macrophages comme véhicules cellulaires pour la thérapie génique paraît prometteuse. Les macrophages pourraient être modifiés *ex vivo* et réintroduits dans le corps où une proportion d'entre eux se dirigerait vers le site de la lésion.

L'utilisation de la thérapie génique ciblant les macrophages peut avoir des incidences thérapeutiques sur plusieurs maladies inflammatoires, médiées par les macrophages et/ou utilisant les macrophages comme réservoir ou site de prolifération.

Des exemples de thérapies ciblant les macrophages, pour le traitement de certaines maladies sont donnés ci-dessous.

2.7.1 Arthrite rhumatoïde

L'arthrite rhumatoïde (AR) est caractérisée par une inflammation chronique du synovium au niveau des articulations, suite à l'hyperplasie des fibroblastes synoviaux et à l'infiltration des lymphocytes et macrophages qui montrent des signes d'activation. Ces cellules prolifèrent de façon anormale et envahissent l'os et le cartilage. Elles produisent une quantité élevée de cytokines pro-inflammatoires, de métalloprotéinases et déclenchent la formation d'ostéoclastes et leur activation. Quelques conséquences

pathophysiologiques peuvent être expliquées par une apoptose inadéquate qui promeut la survie des cellules T autoréactives, des macrophages et des fibroblastes synoviotiques. Les stratégies qui peuvent être applicables en thérapie génique incluent l'inhibition des cytokines pro-inflammatoires, le blocage des métalloprotéinases impliquées dans la dégradation du cartilage et l'inhibition de l'activation des cellules synoviales. L'induction de l'apoptose peut aussi être regardée comme une alternative (Rabinovich, 2000).

L'abondance et l'activation des macrophages dans la membrane synoviale sont grandement corrélées avec la sévérité de l'arthrite rhumatoïde (Kinne et al., 2000). Ces cellules exhibent un effet pro-inflammatoire et destructif répandu et contribuent dans une large mesure à la progression aiguë et chronique de la maladie. La suppression sélective de l'activation des macrophages est une approche possible pour la diminution de l'inflammation locale et systémique et donc de la dégradation au niveau des articulations. Le TNF- α est produit par les macrophages et constitue l'un des facteurs pro-inflammatoires dans la pathogénèse de l'inflammation arthritique (Kinne et al., 2000). Pour inhiber la production du TNF- α , des lipides cationiques ont été utilisés pour véhiculer des ribozymes aux macrophages. Après injection intra-péritonéale (i.p.), la production du TNF par les macrophages fut réduite après stimulation par le LPS (Kisich et al., 1999). Il demeure à démontrer que ce système est capable d'induire la même réponse au niveau des macrophages synoviaux après injection au niveau articulaire. Par ailleurs, Fellowes et al. (2000), en utilisant un système à base de liposomes contenant le plasmide avec le gène de l'IL-10, ont réussi à diminuer l'inflammation dans un modèle d'arthrite induite par le collagène chez la souris. Après injection i.p. l'action anti-inflammatoire fut prolongée jusqu'à 30 jours au niveau articulaire.

2.7.2 Thérapie anti-tumorale

Parmi les cellules effectrices importantes et ayant une activité antitumorale figurent les macrophages cytotoxiques. Ils peuvent exercer, ainsi que leurs produits, des effets

inhibiteurs ou stimulateurs sur les cellules malignes en prévenant ou favorisant la croissance tumorale par des mécanismes qui ne sont pas complètement déterminés (Kisseleva et al., 1996).

Le rôle des macrophages dans l'immunité anti-tumorale est déduit à partir des expériences *in vitro* où il a été démontré que les macrophages activés sont capables de lyser les cellules tumorales plus efficacement qu'ils ne peuvent tuer les cellules normales. Parmi les agents produits par les macrophages et responsables de la destruction des cellules tumorales, figurent les cytokines. Par exemple, les macrophages peuvent exercer un effet tumoricide direct ou indirect, après stimulation par l'interféron (IFN) et lipopolysaccharide (LPS) (Bingle et al., 2002).

Les macrophages sont aussi capables de phagocyter des cellules tumorales apoptotiques et sont impliqués dans la présentation des antigènes associés aux tumeurs aux cellules T. La reconnaissance de ces antigènes spécifiques conduit à la destruction des cellules tumorales. C'est le but de l'immunothérapie anticancéreuse à base de vaccin. Malheureusement, la cytotoxicité des macrophages est sous régulée par les facteurs libérés par les cellules tumorales leur permettant d'échapper aux mécanismes tumoricides (Speiser et Ohashi 1998).

En injectant les gènes directement dans les tumeurs, les protéines seront produites dans le site tumoral. Les thérapies actuelles requièrent une administration systémique de cytokines recombinantes provoquant des effets adverses significatifs et une courte demi-vie de la substance. C'est pour cela qu'il est nécessaire d'utiliser des vecteurs pour les véhiculer et les protéger et augmenter ainsi leur durée de vie comme l'illustrent les études rapportées ci-dessous. Ainsi, des gènes codant pour des anticorps monoclonaux dirigés contre les antigènes spécifiques tumoraux ont été clonés dans des poxvirus atténués. Des macrophages humains et des cellules T cytotoxiques infectés par ces virus ont montré une capacité à tuer les cellules tumorales exprimant ces antigènes *in vitro* (Paul et al., 2000a; Paulet et al., 2000b).

L'IFN est l'un des stimulants puissants de l'activité tumoricide des macrophages; cependant, l'évaluation de cette cytokine dans les essais cliniques, a montré qu'il faut des injections répétées de macrophages activés *ex vivo* pour avoir une réponse clinique. Différentes études ont tenté de contourner ce problème en transfectant les macrophages pour surexprimer les cytokines activatrices. L'un des exemples est l'utilisation de vecteurs rétroviraux pour transfecter des macrophages et induire l'expression d'IFN, IL-4, IL-6, ou de TNF- α . Les résultats ont montré une augmentation de l'activité tumoricide *in vitro* et *in vivo* (Nishihara et al., 1995 ; Ringenbach et al., 1998) ont utilisé le PEI pour la transfection des monocytes avec le gène de l'IFN- γ afin d'augmenter l'activité tumoricide *in vitro*. Les liposomes ont aussi été utilisés pour l'encapsulation de l'IL-2 et -6; suite à leur injection par voie i.p., la cytotoxicité des macrophages est augmentée ainsi que l'expression du complexe d'histocompatibilité MHC-II, conduisant à la destruction des lymphomes chez la souris (Wang et al., 2000).

La cytokine IL-12 possède la capacité de promouvoir une activité cytolytique et une stimulation directe de la production de l'IFN- γ et d'autres cytokines par les cellules T périphériques et les cellules tueuses NK. Elle joue un rôle critique dans la régulation de la réponse immunitaire et ses caractéristiques ont attiré l'attention comme agent potentiel en cancérothérapie. Le "Recombinant DNA Advisory Committee" a donné l'accord de procéder à des études chez l'humain en utilisant l'IL-12 vectorisée par un système rétroviral. Ce système a permis une haute expression de la cytokine et d'éradiquer des tumeurs établies dans plusieurs modèles de murins (Tahara et Lotze, 1995).

2.7.3 Thérapie anti-HIV

Les cibles majeures de l'infection par le virus d'immunodéficience acquise (HIV) sont les cellules sanguines, plus particulièrement, les lymphocytes et les macrophages. Les cellules infectées sont difficilement éliminées, suite à la réponse immunitaire, et le virus

continue à se propager. En concevant des systèmes qui servent à véhiculer des gènes “anti-HIV” aux cellules susceptibles d’infection, des ARN ou des protéines qui interfèrent avec la fonction des ARN/protéines cellulaires, la réplication virale pourrait être inhibée. Par exemple, des nanoparticules à base d’acide poly (D,L-lactique) ont été utilisées, *in vitro*, pour encapsuler et véhiculer des oligonucléotides anti-sens dans des cellules infectées par le virus HIV-1. Les résultats ont montré une forte inhibition de la production des virus par les oligonucléotides, suite à l’encapsulation (Berton et al., 2001). Une autre étude a utilisé les liposomes contenant les oligonucléotides anti-sens de l’élément Rev (responsable de l’export nucléaire de l’ARNm viral) et le ribozyme complémentaire de l’extrémité répétitive 5’ du HIV-1 (qui contient un important promoteur viral). Les résultats ont montré une inhibition de la réplication du virus allant jusqu’à 90% dans les macrophages (Duzgunes et al., 1999).

Un autre exemple a consisté à conférer une résistance à l’infection par le HIV-1 aux macrophages; ces derniers ont été transfectés par des rétrovirus contenant le gène IFN- β *in vitro*. En plus de l’inhibition de la réplication des virus, une augmentation de la sécrétion de l’IL-12 et l’IFN- γ a été constatée, stimulant ainsi des réponses immunitaires contre le HIV par d’autres cellules (Cremer et al., 2000).

2.7.4 Thérapie cardiovasculaire

L’athérosclérose est une maladie inflammatoire impliquant le recrutement et l’activation des macrophages, des cellules musculaires lisses et des lymphocytes T. Les macrophages accumulent les lipoprotéines de basse densité (LDL) qui deviennent athérogènes suite à leur oxydation au niveau de la paroi artérielle (Hegyí et al., 2001). Cette oxydation conduit alors à la disfonction vasculaire : i)- en exerçant un effet cytotoxique direct sur les cellules endothéliales, ii)- en augmentant les propriétés chimiotactiques des monocytes qui augmentent la prolifération des macrophages et leur transformation en cellules spumeuses (macrophages ayant digéré des LDL, saturés de gouttelettes de graisse;

ils ressemblent à de la mousse au microscope), iii)- en augmentant la prolifération des cellules musculaires lisses. Pour diminuer ces facteurs qui contribuent grandement au développement de l'athérosclérose, des stratégies ciblant les macrophages ont été développées.

Laukkanen et al. (2000) ont utilisé un vecteur adénoviral pour inhiber l'oxydation des LDL et la transformation des macrophages en cellules spumeuses. Pour prévenir la rupture de plaque athérosclérotique qui peut conduire à la formation de thrombus occlusif, une première approche a consisté à transférer des gènes dont le produit contribuerait à stabiliser la plaque vulnérable en réduisant son contenu en lipides et en macrophages. Une seconde approche, visant à inhiber la formation du thrombus, a consisté à véhiculer des gènes codant pour des protéines thrombolytiques ou des facteurs de croissance capables de restaurer les fonctions antithrombiques des cellules endothéliales (Feldman et Isner 1995).

CHAPITRE III

3. POTENTIEL THÉRAPEUTIQUE DES SYSTÈMES NANOPARTICULAIRES POUR CIBLAGE DES MACROPHAGES

Ce chapitre est un article de revue de littérature qui dresse l'avancement des travaux effectués sur le ciblage des macrophages par les systèmes nanoparticulaires et les visées thérapeutiques escomptées.

Cet article met l'emphasis sur les systèmes non-viraux à cause de leur faible toxicité et immunogénicité par rapport aux systèmes viraux. Comme il a déjà été décrit précédemment, les macrophages ont un rôle central dans le déclenchement des réactions inflammatoires et constituent un réservoir pour les pathogènes impliqués dans les maladies inflammatoires.

Malheureusement, les médicaments utilisés induisent souvent des effets indésirables majeurs lorsqu'ils sont utilisés sous la forme libre, en plus de leur instabilité dans les milieux physiologiques. C'est pour ces raisons qu'il devient nécessaire de les coupler à des agents de transport pour éviter ces inconvénients. Les systèmes nanoparticulaires sont alors développés pour optimiser l'internalisation des médicaments au niveau des cellules et de les protéger contre la dégradation, augmentant ainsi leur efficacité et réduisant leurs effets secondaires.

De plus, le lien entre l'efficacité des systèmes nanoparticulaires et leurs propriétés physico-chimiques qui affectent leur interaction avec les macrophages sont décrits.

Cet article est accepté pour publication dans la revue «Biomaterials» sous le titre original de «Therapeutic potential of nanoparticulate systems for macrophage targeting».

THERAPEUTIC POTENTIAL OF NANOPARTICULATE SYSTEMS FOR MACROPHAGE TARGETING

Fatiha Chellat ^{1,2}, Yahye Merhi², Alain Moreau³, L'Hocine Yahia¹

*¹Biomedical Engineering Institute, École Polytechnique de Montréal, Montréal, Québec,
Canada*

*²Montreal Heart Institute, and the University of Montreal
Montréal, Québec, Canada*

³Centre de recherche de l'hôpital Sainte-Justine, Montréal, Québec, Canada

Keywords: Review, macrophage targeting, nanoparticles, inflammatory diseases.

3.1 Abstract

The use of non-viral nanoparticulate systems for the delivery of therapeutic agents is receiving considerable attention for medical and pharmaceutical applications. This increasing interest results from the fact that these systems can be designed to meet specific physicochemical requirements, and they display low toxic and immunogenic effects. Among potential cellular targets by drug-loaded nanoparticles, macrophages are considered because they play a central role in inflammation and they act as reservoirs for microorganisms that are involved with deadly infectious diseases. The most common and potent drugs used in macrophage-mediated diseases treatment often induce unwanted side effects, when applied as a free form, due to the necessity of high doses to induce a satisfactory effect. This could result in their systemic spreading, a lack of bioavailability at the desired sites, and a short half-life. Therefore, the use of drug-loaded nanoparticles represents a good alternative to avoid, or at least decrease, side effects and increase efficacy. In this manuscript, we present an overview of the usefulness of nanoparticles for macrophage-mediated therapies in particular. We discuss, though not exhaustively, the potential of therapeutic agent-loaded nanoparticles for some macrophage-mediated diseases. We also underline the most important parameters that affect the interaction mechanisms of the macrophages and the physicochemical aspects of the particulate systems that may influence their performance in macrophage targeted therapies.

3.2 Introduction

The use of non-viral nanoparticulate systems has gained increasing interest within therapeutics, revealing exciting prospects. Due to their low toxicity in comparison with viral systems [1], they are good candidates for targeting tissue and cells with different compounds. For this purpose, drugs, peptides and nucleic acids of poor stability have been combined with polymers and lipids to obtain very fine, submicron particulate systems that have the ability to interact with the cells and be internalized by them. The potential therapeutic applications of these systems are enormous and were reviewed elsewhere by various authors. For example, applications for drug delivery systems, cancer therapy and diagnosis, gene therapy and immunomodulating activities have been reported [2-6]. The main advantage of using nanocarriers resides in the possibility of conjugating them to specific ligands so that they can be directed to a desired cell type, tissue or organ [7]. Also, optimized synthesis conditions and physicochemical characteristics could allow a desired therapeutic level to be reached [8,9]. However, applications of nanoparticles are limited by their rapid recognition by the reticuloendothelial system (RES). In fact, they are cleared from the bloodstream within minutes upon intravenous injection, depending on their size and surface characteristics [10,7,11]. The rapid uptake of nanoparticles is problematic when the long-term circulation of nanoparticle-loaded drug systems is needed. To overcome this problem, surface modifications using polyethylene glycol (PEG) have been achieved in the case of polymeric drug carriers and liposomes [12,13]. Another work also showed that the use of the amphiphilic diblock copolymer monomethoxypoly(ethylene oxide)-poly(lactic acid) (MPEO-PLA) for the preparation of nanoparticles delays their phagocytosis [14]. However, the efficacy of the coating procedure to hinder opsonization depends on the chain length and the density of these moieties at the surface of the particles [15]. Among the most studied nanocarriers are the polyalkylcyanoacrylate (PACA) nanoparticles, which can be prepared either by polymerization of alkylcyanoacrylate monomers or directly from the polymers. The different preparation methods lead to the obtaining of

nanospheres, oil- and water-containing nanocapsules and core-shell nanospheres (Fig. 3.1) [16]. PACA-based nanoparticles are considered to be very promising and have the capacity to bind a wide range of drugs in a nonspecific manner, thus expanding their usefulness for several therapies. The pioneer works of Couvreur et al [17] on PACA nanoparticles constituted the base for further developments in drug targeting to specific sites in the body, with a particular emphasis on cancer chemotherapy [18-20]. In addition, PACA nanoparticles were used for insulin loading and were found to prolong the effect of the drug in a diabetic rat model [21]. Their potential use as carriers for antisense oligonucleotides (ODN) has also been reported [22]; this study showed the efficacy of PACA nanoparticles in protecting ODN from 3'-exonuclease. In another study, the uptake and stability of PACA-adsorbed ODN were significantly increased in epithelial cells HBL100 [23]. Overall, it has been postulated that a dual and synergistic effect of PACA nanoparticles can be achieved by combining different drugs during the synthesis and loading process. This could represent an additional advantage for the control of drug release depending on the adsorption or entrapment of a given drug in the polymeric network [24].

Nanoparticles are also receiving attention as vectors for functional small interfering RNA (siRNA) [25,26], which are generally composed of 21-23 nucleotides and are designed to degrade a specifically targeted mRNA [27-29]. Their use has been considered for targeting the lung in mice in order to modulate respiratory syncytial virus (RSV) infection. In this study, the animals were treated intranasally with siNS1 nanoparticles before or after infection by an RSV. The results showed a significant decrease of virus titers and of inflammation [30]. siRNA nanoplexes were also evaluated for their potential inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression after intravenous administration into tumor-bearing animals. They showed evidence of a sequence-specific inhibition of the target gene as well as a reduction in angiogenesis and inhibition of tumor growth [31].

Currently, macrophage-mediated therapies constitute many well accepted and promising approaches to treating diseases. To succeed in macrophage targeting, a good knowledge

of their surface structure and the mechanisms governing their interaction with particulate systems is necessary. Accordingly, this review addresses some specific issues related to the mechanisms of nanoparticle uptake by macrophages, with emphasis on their physicochemical properties and their toxicity since these are central to macrophage induced responses and the efficacy of vectorized drugs. We specifically address the usefulness of nanoparticulate systems for macrophage therapies of bacterial and viral infectious diseases as well as inflammatory diseases, such as atherosclerosis, rheumatoid arthritis, and multiple sclerosis (MS).

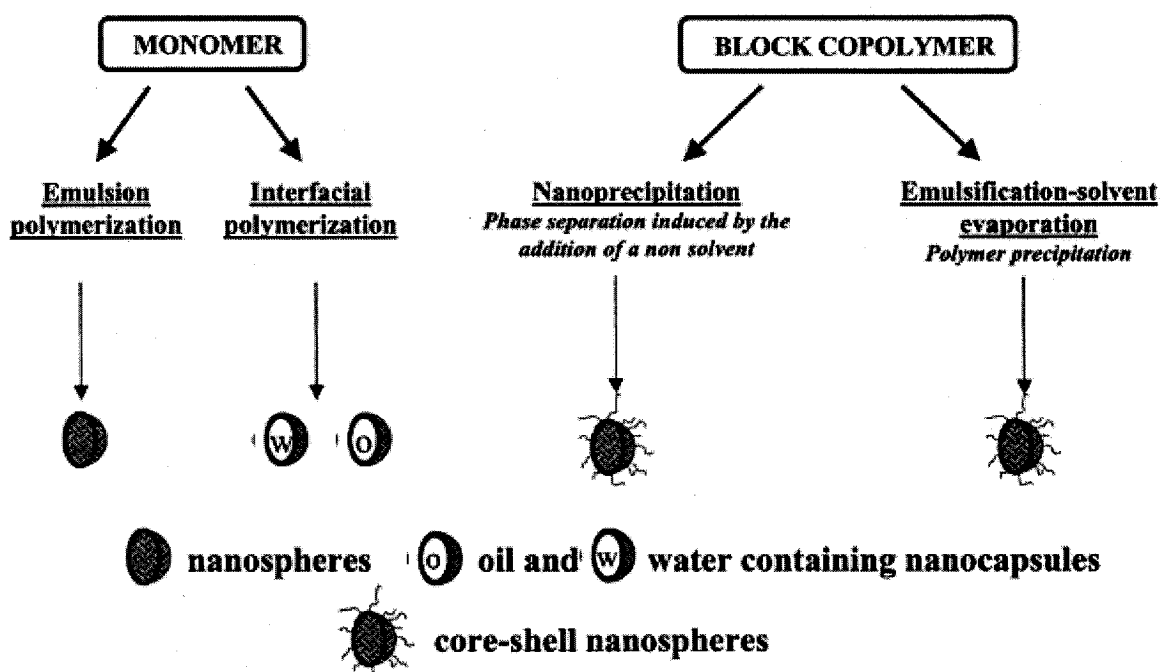


Figure 3.1 Summary of the different methods developed for the preparation of PACA nanoparticles with the corresponding types of nanoparticles produced. (Reproduced with permission from reference [16]).

3.3 Macrophage targeting

3.3.1 Phagocytosis and nanoparticle uptake versus efficacy

It is well known that macrophages are predominantly involved in the uptake of nanoparticles, leading to their degradation and clearance from the bloodstream [32]. This is related to the opsonization process, which results in their phagocytosis after the adsorption of complement components such as immunoglobulin G (IgG) and fibrinogen [33,34]. *In vitro*, the uptake of nanoparticles by J-774 macrophages has been shown to occur via an endocytosis process, after which the particles end up in the lysosomal compartment (Fig. 3.2) [16] where they are degraded, thus affecting the delivery of the drugs to the cytoplasm of cells. The escape from the endolysosomal compartment is then necessary for the enhancement of the efficacy of carried therapeutics, especially those that are susceptible to degradation in acidic environments [35-37]. To destabilize the lysosomal membrane, compounds such as cationic surfactants are added to the nanoparticles [22]. The concept of the “proton sponge” has also been introduced, based on the hypothesis that polymers with buffering capacities between 7.2 and 5.0, such as polyethylenimine (PEI) and imidazole-containing polymers, can buffer the endosome and potentially induce its rupture [38,39].

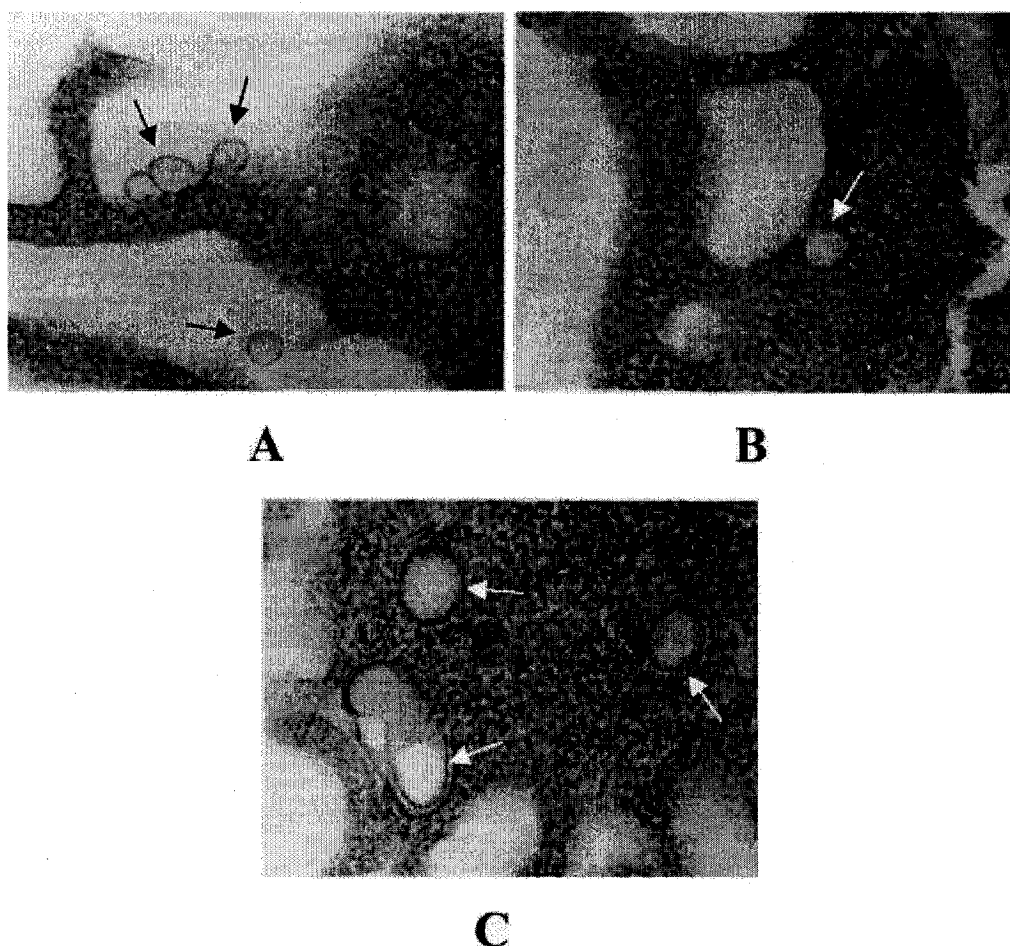


Figure 3.2 Endocytosis of PACA nanospheres by J774 macrophages in culture cells as observed by transmission electron microscopy. (A) Interactions of nanospheres with the cell membrane (arrows). (B) Endocytosis of a nanosphere. (C) Nanospheres in phagosomes (arrows). (Reproduced with permission from reference [16]).

Macrophages are known to play a central role in an organism's protection against infectious agents. To distinguish between those and self, a restricted number of macrophage phagocytic receptors are evolved, like the mannose receptor [40] that is involved in the recognition of conserved motifs on pathogens. Also, unlike other glycoprotein receptors, the mannose receptor has the ability to mediate the phagocytosis

of saccharide-coated particles as well as the pinocytosis of soluble glycoconjugates [41]. This characteristic is exploited in nanoparticulate systems for macrophage-mediated therapies by incorporating specific ligands that facilitate their entry into the cells. For example, the incubation of mannan-coated nanoparticles with a mannose receptor-positive mouse macrophage cell line (J-774E) was effective in increasing their uptake [42]. The mannose receptor is a transmembrane glycoprotein that is mainly expressed by macrophages and has the capacity to be rapidly internalized from the plasma membrane, via clathrin-coated vesicles, to allow a delivery into the endosomal system. It has been estimated that the endocytosed receptors mediate ten or more rounds of recycling each hour [43]. The receptor has been purified from macrophages [44-46] and has been shown to be involved in a specific binding to mannosylated molecules so as to mediate their endocytosis. This receptor requires Ca^{2+} for ligand binding [47] and is distinguished from other receptors by a unique spectrum of sugar ligands: mannose and fucose are the most potent monosaccharide ligands, while N-acetylglucosamine and glucose bind with lower affinity [48]. Saturation of these specific sites in macrophages, by preincubating the cells with free mannan, prevented the increase of nanoparticle ingestion [42], attesting, at least, that the mannose receptor contributes to nanoparticle internalization by macrophages. Moreover, it has been shown that, *in vitro*, the presence of fetal calf serum is necessary for the adsorption of nanoparticles to the macrophage cell surface, as well as for their internalization. This could be explained by the presence of opsonins in the serum, which cover the nanoparticles and allow their recognition by specific receptors present on the macrophage membrane. This view is supported by the absence of nanoparticle internalization by other cell types such as human erythroleukemia (K562), human breast adenocarcinoma (MCF7) and rat glioblastoma (C6) cells [49].

Liposome-protamine-DNA (LPD) nanoparticles were engineered by combining cationic liposomes with polycation-condensed DNA to form a virus-like structure with the condensed DNA located inside the lipidic membrane [50,51]. To take advantage of the expression of mannose receptors on the surface of macrophages [52], the LPD nanoparticles were coated with mannan for the enhancement of antitumor activity [53].

As an approach to DNA vaccine therapy, the formulation of mannosylated cationic liposomes demonstrated an enhancement of immune responses in a mouse model after intravenous administration, and more efficient antigen epitope presentation on the MHC class I complex in cultured mouse peritoneal macrophages [54].

D-galactose receptors have also been reported to participate in the recognition of nanoparticles by macrophages. Colloidal gold nanoparticles of 17 nm diameter coated with human and rat plasma fibronectin have experienced rapid binding and endocytosis by macrophages. Experiments done in the presence of D-galactose showed a specific inhibitory uptake, allowing the conclusion that the D-galactose macrophage receptor binds to D-galactose-related units of immobilized plasma fibronectin on the nanoparticles [55].

A non-opsonic attachment to the macrophage surface, via scavenger receptors, has also been reported to take place during the phagocytosis of particulate systems [56]. Receptors of this class are known to bind polyanionic macromolecules and particles, including lipopolysaccharides of gram-negative bacteria and lipoteichoic acid of gram-positive bacteria [57,58]. They are also responsible for binding chemically altered or oxidized proteins and lipoproteins [59]. In a study on the internalization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles, the implication of the scavenger receptor was proven by performing a competition experiment between the nanoparticles and the scavenger receptor ligands, which resulted in the inhibition of nanoparticle uptake by mouse peritoneal macrophages. Moreover, this study showed a direct relationship between the size and the uptake of the nanoparticles after their incubation with a THP-1 macrophage cell-line [60].

A comparative phagocytosis study was performed on three types of fluorescein-labeled test particles attached to different receptors (scavenger, mannose, Fc) in rat alveolar macrophages. The results showed that the particles bound to the mannose receptor were ingested in the shortest time, and particles bound to the Fc receptor were ingested almost as rapidly, whereas particles bound to scavenger receptors were ingested at a distinctively slower rate [61].

On the other hand, it has been shown that various types of receptors may cooperate to optimize the binding and internalization of particles [62,63]. Also, the availability of macrophage receptors, in terms of number and nature, are dependant on the differentiation and activation states of the cells [64]. These parameters should be taken into account when designing nanoparticles for macrophage targeting.

It should be mentioned, however, that not only macrophages are involved in nanoparticle uptake. In a guinea pig model, Zambaux et al [65] highlighted the important role of neutrophilic granulocytes in PLA and MPEO-PLA nanoparticle uptake. The fluorescent nanoparticles, with a mean size of 170 nm and 220 nm, respectively, were administered via the left femoral artery. A blood specimen analysis by flow cytometry showed that, as early as 9 minutes after administration, about 30% of the granulocytes were fluorescent. This percentage decreased progressively to reach 10% after 22 hours. The collection of the spleen 30 h after administration of the nanoparticles, followed by a histological analysis, allowed an observation of the fluorescent nanoparticles that were present in the neutrophils. In addition, the progressive decrease in the number of neutrophils in the blood, 1 h post-administration, was correlated with the decrease in fluorescent cells (neutrophils with fluorescent nanoparticles). Taken together, these results suggest a migration of neutrophilic granulocytes towards tissues, such as in the spleen, where they will be destroyed. It should, however, be pointed out that in this study, the number of monocytes was very low in comparison to neutrophils. Also, 220 nanoparticles per circulating phagocytosing cell (neutrophils and monocytes) were injected; this could explain the increase in granulocyte blood population as being a reaction to foreign particle invasion. In a previous study by Gibaud et al. [66], the role of neutrophils in the uptake of doxorubicin-PIHCA and fluorescently labeled polystyrene nanoparticles (240 ± 26 nm and 201 ± 43 nm, respectively) was in agreement with the study by Zambaux et al. However, the role of neutrophils was not predominant in comparison to that of monocytes/macrophages; in their mouse model, they showed that, after 3 and 6 h, doxorubicin nanoparticles were captured at similar rates by monocytes and neutrophils.

After these periods they were mainly found in monocytes. In the spleen, macrophages of the marginal zone were found to be the most active capturing cells.

3.3.2 Physicochemical properties and nanoparticle uptake

The rate of phagocytosis is largely determined by the physicochemical properties of the substrate, and it is increased when the substrate adopts the form of a particle [67]. The surface modification of nanoparticles is a crucial issue in terms of their uptake by cells and targeted tissue [68]. When using nanoparticulate systems, cell interactions and elicited responses, as well as loading efficiency and efficacy, are dependant on the physical characteristics and morphology, chemical structure and functionality, surface charge, hydrophobicity and hydrophilicity. The hydrophilicity/hydrophobicity of the surface governs the adsorption of plasma proteins on the particles and is expected to influence macrophage uptake. Augmented particulate hydrophobicity is known to increase the uptake by forming hydrophobic interactions with the cell surface [69]. One of the conducted studies that proved this concept involved the modification of polystyrene beads by adsorbing increasingly hydrophilic block copolymers (poloxamers 184, 188 and 407); the authors showed that the more hydrophobic the particles, the larger the total amount of bound protein [70]. In accordance with this study, latex particles displaying a low hydrophobicity induced up to six times lower the protein adsorption. The pattern of protein adsorption depended on the type of the protein and the nature of the functional groups held by the particles. Thus, sterical conformation could hinder protein adsorption. After incubation in citrate-stabilized human plasma for 5 min at 37°C, it has been shown that the major proteins adsorbed on the latex particles were fibrinogen and IgG [71].

The phagocytic uptake of polyethyleneglycol (PEG)-coated nanoparticles is influenced by surface modification and the use of stabilizers [72,73]. For polyethylcyanoacrylate (PECA) amoxicillin loaded nanoparticles, the uptake by a J-774 macrophage cell line was reduced upon coating them with PEG, especially when the higher molecular weight was

used. Their surface charge was decreased by means of increasing the molecular weight of the PEG, which is in agreement with the presence of hydrophilic PEG chains on the surface of the nanoparticles. Fontana et al. showed that PEG coating of PECA nanoparticles resulted in a decrease of their average size from 320 ± 12 nm to 220 ± 10 - 280 ± 8 nm upon coating with PEG, depending on the molecular weight [74]. In this study, the phagocytosis of the nanoparticles was determined by measuring the amount of amoxicillin inside the macrophages by HPLC. After 90 minutes, the results showed that the uptake of the nanoparticles by murine macrophages was decreased by 50% and 70% after coating by PEG 2000 and PEG 4000, respectively, in comparison to uncoated nanoparticles. Also, the drug release has been shown to be proportionally dependant on the molecular weight of the PEG and related to the increase in nanoparticle hydrophilicity.

The binding ability of nanoparticles to macrophages is also dictated by their charge and the moieties they display. Macrophages display negatively charged sialic acid on their surface [75,76] and it has been hypothesized that positively charged nanoparticles bind to these residues and are subsequently phagocytosed. To support this hypothesis, alveolar macrophages were collected by saline lavage from normal rat lungs and then treated with wheat germ agglutinin (WGA) and limulus protein (which is known to bind specifically to sialic acid) conjugated with 50 nm gold particles [77]. Subsequent incubation of the pretreated cells with positively charged carbonyl iron (C-Fe), aluminum and chrysotile asbestos fibers spheres resulted in a binding inhibition of the positively charged spheres to the macrophage surface. On the contrary, the pretreatment with lectins did not block negatively charged glass spheres nor crocidolite asbestos fibers from binding to the macrophage surface. When both positively charged iron spheres and negatively charged glass spheres were prebound to alveolar macrophage membranes, subsequent treatment with WGA displaced only the positively charged spheres from the macrophage surfaces. This study demonstrates the implication of the sialic acid residue in the binding of positively charged particles to macrophages. It also highlights the importance of the surface charge of particles for the binding to macrophage surfaces as well as the diversity

of the mechanisms of the phagocytosis process. Another study demonstrated a linear relationship between the nanoparticles' zeta potential and their phagocytosis by macrophages [78]. Particles with a zeta potential close to zero have been found to be less phagocytatable in comparison with charged particles [79]. In fact, the phagocytosis rate did not differ for cationic and anionic particles displaying the same absolute value [69]. Superparamagnetic particles with negative surface charges possess a high but non-specific affinity for the plasma membrane, which favours their adsorption and endocytosis in endosomal compartments [80,81]. This uptake mechanism is suitable when the preservation of the engineered nanoparticle surface is required, as for magnetic resonance imaging [82].

The experimental conditions when preparing loaded nanoparticles influence their properties. For example, the stability and subsequent uptake of gelatin nanoparticles by macrophages was dependant on molecular weight [83]. In the case of modifying the nanoparticle surface using PEG, varying the presence of additives and the molecular weight results in the formation of nanoparticles with differing particle size, zeta potential, drug loading capacity, drug release rate and phagocytic uptake by murine macrophages [74].

3.4 Nanoparticles and macrophage cytotoxicity

When designing a nanodelivery vehicle, the choice and nature of the vectorization agent are of great importance from the cytotoxicity point of view. For example, in polymer based formulations, polyisohexylcyanoacrylate nanoparticles showed a greater cytotoxic effect than polyisobutylcyanoacrylate particles [84]. Another study by Cruz et al. showed that the use of polyalkylcyanoacrylate nanoparticles (PMCA, PECA, PBCA and PIBCA nanoparticles) exhibited a cytotoxic effect in peritoneal resident and thioglycolate-elicited macrophages. Their uptake by peritoneal macrophages caused an increase in respiratory burst and induced the release of soluble toxic factors into the culture medium [85].

Polymers with a high cationic density were used for DNA condensation to facilitate their internalization by the cells. However, this high charge density contributes to their cytotoxicity [86,87], thus optimizing the balance between polymer charge and endosomal-escape moieties is a solution to consider when designing polycationic delivery systems [88]. Poly(L)lysine (PLL) was also used for DNA condensation and delivery to the cells. The nanoparticles obtained using PLL with a low molecular weight showed less toxicity than those that employed PLL with a high molecular weight [89].

When developing solid lipid nanoparticles (SLN), the cytotoxic effects and a possible up-regulation of pro-inflammatory cytokines must be taken into account. In fact, the lipid matrices and surfactants used for nanoparticle fabrication have to be chosen carefully to ensure the safety of the system. When comparing the effect of different lipid matrices, Scholer et al. observed a marked cytotoxic effect when murine peritoneal macrophages were incubated with SLN consisting of stearic acid (STE) or dimethyldioctadecylammonium bromide (DDA) at concentrations of 0.01%, whereas SLN made of triglycerides, cetyl palmitate or paraffin did not induce a major cytotoxic effect at the same concentrations. In their work, the concentration-dependant cytotoxicity was demonstrated, whereas the size did not influence the cytotoxicity or cytokine production [90]. The choice of stabilizing surfactants is also a critical factor. It has been shown that Dynasan 114 SLN are well tolerated by RAW 264.7 macrophages, from the point of view of cytotoxicity, when produced with pharmaceutically accepted surfactants for intravenous injection such as poloxamer 188, Lipoid S75, sodium cholate and Tween 80 [91]. Similarly, when thiomersal was used as a preservative agent for compritol (CO) or cetyl palmitate (CP) nanoparticles, increased cytotoxicity and immunomodulatory effects following incubation with murine peritoneal macrophages were not induced [92]. Poly(D, L-lactide) nanoparticles loaded with albendazole (1 $\mu\text{g/mL}$) showed no cytotoxic effect on the peritoneal macrophages of mice, *in vitro* or *in vivo*, after intravenous injection (6mg/kg). The efficacy of injected albendazole loaded nanoparticles was equivalent to that of 1500 mg/kg of the free drug after oral administration (250-fold higher) [93].

As particulate foreign bodies, nanoparticulate systems could induce a host response, such as a secretion of inflammatory cytokines and MMPs that play a major role in tissue destruction and remodeling. The response of macrophages is of great importance because they are the first cells to intercept the carriers after *in vivo* administration. Upon nanoparticle ingestion, macrophages may release an assortment of active substances that have potentially deleterious effects on surrounding tissues. In a previous study, we demonstrated that the concentration and incubation period of chitosan-DNA (Ch-DNA) nanoparticles with macrophages is important. Indeed, we found that metalloproteinase (MMP)-9 secretion by THP-1 macrophages was stimulated after 24 hours incubation with the nanoparticles, and then increased as a function of time (Fig. 3.3). However, no TNF- α , IL-1 β or IL-6 was detected in the cell supernatants after cytokine dosage by ELISA [94]. These findings are in agreement with the study performed by Gaspar et al. [95]. While the incubation of a J774G8 macrophage-like cell line with PACA nanoparticles induced hydrogen peroxide production, no release of cytokines could be detected. This suggested that the assessment of inflammatory cytokines by ELISA is not sufficient for a complete study of the effects of nanoparticles on macrophages. This test should be combined with other assays, such as tests for the activation of respiratory burst in macrophages and metalloproteinase production.

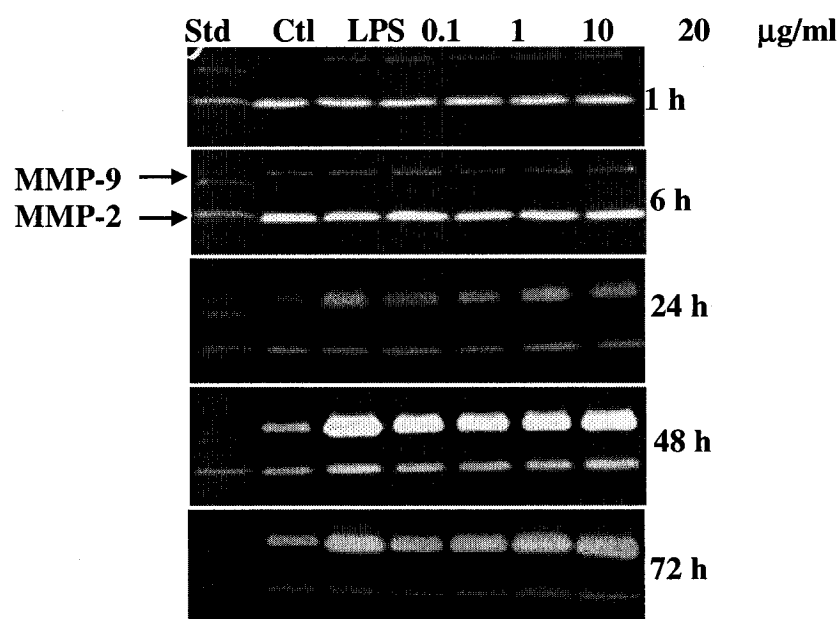


Figure 3.3 Time-course detection of MMP-9 and MMP-2 gelatinolytic activity in cell supernatants was determined by zymography. Densitometry quantification of lysis zones indicates a significant increase of MMP-9 activity in comparison with the control after 24 hours. MMP-2 secretion was similar to that of the control and not affected by the incubation periods and nanoparticle concentrations.

3.5 Nanoparticulate systems for macrophage-mediated therapies

3.5.1 Bacterial infectious diseases

Macrophage-specific delivery systems are particularly attractive because macrophages act as host cells for many parasites and bacteria that give rise to the outbreak of so many deadly diseases. Besides the advent of other classical drugs carriers, polymeric nanoparticles have been explored for their effective use in experimental infectious diseases upon macrophage targeting. For instance, several studies have reported the effects of *Leishmania*, which is a parasite that causes various infectious diseases; it can spread to the visceral organs such as liver and spleen, resulting in visceral leishmaniasis, or to mucous membranes of the mouth and nose. If untreated, these diseases provoke high rates of mortality. The localization of these parasites within the lysosomal vacuoles of reticuloendothelial macrophages hampers the access and bioavailability of antileishmanial drugs. This fact drove several groups to design nanocarriers for targeting antileishmanial drugs to macrophages so as to increase their bioavailability. In addition, the encapsulation of antileishmanial drugs is suitable for overcoming their adverse side effects. For example, the consequences of using Amphotericin B have been largely reviewed by Lowery and Greenberger [96]. They highlight their major implication in the induction of inflammatory mediators, such as interleukin (IL)-1 and tumour necrosis factor (TNF)- α , in human and murine mononuclear cells [97-99]. When associated with poly(ϵ -caprolactone) nanospheres stabilized with poloxamer 188, the drug not only showed an improvement in its efficacy, but also an inhibitory effect on the IL-1 and TNF- α cytokines production in mouse peritoneal macrophages [100]. Also, nanoencapsulated quercetin was found to reduce the parasite burden in the spleen, as well as reduce hepatotoxicity and renal toxicity [101].

Gentamycin, another well known antibiotic with severe side effects, was bound to polybutylcyanoacrylate to make nanoparticles for intracellular delivery to mouse intraperitoneal macrophages. Gentamycin tritium labeling allowed the quantification of intracellular radioactivity, which was 6.34 times higher in the cells after 30 minutes incubation [102]. Poly (D,L-Lactide) nanoparticles were also used against *Leishmania*

donovani activity after loading them with primaquine. The association of the drug with the nanoparticles exhibited an efficacy that was 3.3 times higher than the free form and resulted in a reduced toxicity. No systemic toxicity was observed for 600mg/kg of PLA nanoparticles loaded with 30 mg of primaquine after intravenous injection in BALB/c mice, yet the same dose of the free drug resulted in a 15% weight loss of the animals [103]. Polyisohexylcyanoacrylate (PIHCA) nanoparticles were also used for an *in vitro* targeting of primaquine to macrophages. In this case, the antileishmanial activity of the nanoparticle-loaded drug exhibited a 21-fold increase in ED50 [104].

Rifampicin loaded polybutylcyanoacrylate nanoparticles were used against *Staphylococcus aureus* and *Mycobacterium avium* that were infecting alveolar macrophages. The drug levels in the cells increased 2 to 3-fold after incubation with rifampicin loaded nanoparticles, in comparison to the free drug. The therapeutic efficacy was also demonstrated *in vivo*, where a single administration of rifampicin nanoparticles resulted in an 80% survival of mice with salmonellosis, while a two-fold concentration of free rifampicin could provide only 10% survival. The effective delivery to macrophages could be responsible for the high antibacterial efficacy of rifampicin bound to nanoparticles [105].

PIHCA nanoparticles were used to deliver ampicillin to mouse macrophages *in vitro* [106]. After labeling them with tritium, ampicillin-loaded PIHCA nanoparticles were localized at the intracellular level in *Salmonella typhimurium* infected peritoneal and J-774 murine macrophages. The penetration and bactericidal effect of the drug was found to increase by means of nanoparticles, plus the process of bacteria destruction began within time periods as short as 2 to 4 hours [107]. A strong association between the ampicillin-loaded nanoparticles and bacteria within the phagosomes or phagolysosomes, at the intracellular level, could explain the efficacy of the bound ampicillin, which otherwise is taken up by the cells at very low levels [108].

The phagocytosis of polyalkylcyanoacrylate (PACA) nanoparticles by J-744 macrophages induced the activation of a respiratory burst, which led to augmented antileishmanial action [95]. When methacrylate nanospheres were used to deliver

pentamidine to a human macrophage cell line U 937, the drug was 25 times more active than in the case of the free form [109]. Taken together, the efficacy of nanotargeted drugs to macrophages, during bacterial infection, can be attributable to the maintenance of higher drug levels inside the infected monocyte/macrophagic system [110].

3.5.2 Viral infectious disease: AIDS Therapy

In AIDS therapy, macrophages could be targeted since they represent a cell population of the reticuloendothelial system that plays an important role in the immunopathogenesis of the disease. The effectiveness of human serum albumin and polyhexylcyanoacrylate nanoparticles loaded with nucleoside analogues (AZT and ddC) was demonstrated based on their ability to prevent HIV infection in monocytes/macrophages cultures from blood donors [111]. In a rat model, intravenously injected colloidal ¹⁴C-labelled AZT nanoparticles were detected in the organs of the reticuloendothelial system in concentrations as high as 18-fold those of unbound AZT. Thus, increasing drug concentrations at specific sites where macrophages are abundant may allow a reduction in the dosage and, as a result, a decrease in systemic toxicity [112]. Similarly, when administrated orally, AZT loaded nanoparticles demonstrated a more efficient delivery to macrophage-rich organs, in addition to an increased concentration and availability of the drug in the blood [113].

The influence of composition and size on nanoparticle incorporation was demonstrated by assessing the capacity of HIV infected macrophages to phagocytose various types of radiolabelled AZT-loaded nanoparticles (PACA, polyhexylcyanoacrylate (PHCA), polymethylmethacrylate (PMMA), and human serum albumin (HSA)). It was found that the antiviral drug was delivered more successfully when PHCA and HSA nanoparticles with a diameter of about 200 nm were used [114].

In another study, infected primary human monocytes/macrophages were targeted with the protease inhibitor saquinavir (Ro 31-8959) or the nucleoside analog zalcitabine (2',3'-dideoxycytidine) loaded PHCA nanoparticles *in vitro*. Both formulations showed an

increased antiviral activity in a dose-dependant manner, as determined by a reduction of HIV type 1 antigen production, though a significantly higher efficacy was achieved with the saquinavir-loaded nanoparticles. While an aqueous solution of saquinavir at 10 nM produced only a slight antiviral effect, drug loaded nanoparticles exhibited a very potent antiviral activity at 1 nM. Even at lower concentrations (0.1 nM), the antigen reduction level remained significant: 0.39 nM of the nanoparticle-bound drug produced 50% inhibitory effect in comparison to 4.23 nM of the free drug [115]. These are encouraging examples of the improved delivery of antiviral agents to mononuclear phagocyte systems, which may eventually overcome pharmacokinetic problems *in vivo* and enhance the activity of drugs for the treatment of HIV infections and AIDS.

3.5.3 Inflammatory diseases

The rationale for using macrophage targeted therapies is based on their direct or indirect implication in a wide range of diseases, particularly those that are inflammatory-based. Indeed, macrophages play a critical role in the initiation and maintenance of inflammation that leads to tissue destruction (Fig. 3.4). In this section, some inflammatory diseases that could be treated by macrophage targeting by nanocarriers are addressed.

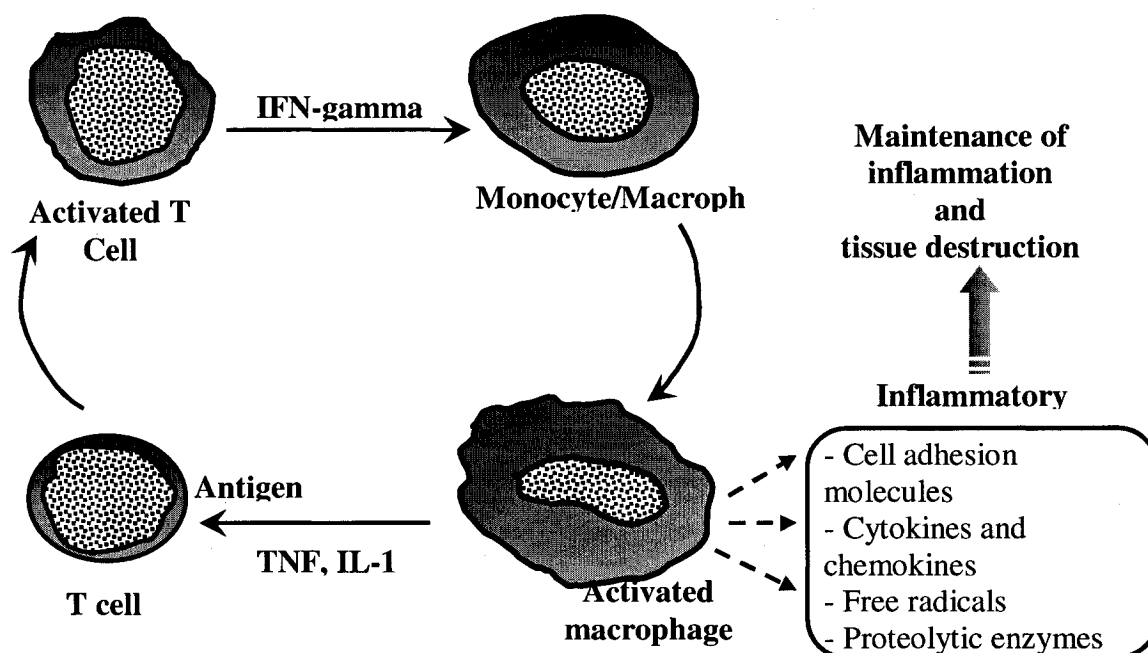


Figure 3.4 Schematic representation of the role of macrophages in the initiation and maintenance of inflammation.

3.5.3.1 Atherosclerosis and restenosis

Inflammatory changes in the arterial wall play a central role in the development of atherosclerosis [116,117]. Atherosclerosis is characterized by a chronic inflammatory process during which monocytes/macrophages are attracted to the vessel wall [118]. In fact, it has been shown that approximately 80% of leukocytes in animal and human atherosclerotic lesions are monocytes/macrophages [119]. Their activation, expression of specific cell adhesion molecules (CAMs), and secretion of proinflammatory cytokines [120,121] chemokines, and matrix metalloproteinases [122], promote atherosclerotic lesions and plaque vulnerability. A multi-step series of adhesive and signaling events regulates these events. To initiate these responses, circulating leukocytes must adhere to the vascular wall under shear forces with the cooperation of various CAMs. The first reactions, which involve the slowing and rolling of leukocytes on inflamed endothelium,

involve mainly the selectin family of CAMs [123]. These reactions induce the activation and firm adhesion of leukocytes via the integrin family, followed by their transmigration into the sub-endothelial area. The phagocytosis of nanoparticles by macrophages, which might induce their activation and modulation of the specific CAMs involved in their adhesion, could significantly affect any of the different steps and consequently result in their accumulation in the tissue. However, this issue is still unexplored and further studies are needed to appropriately address these questions. In spite of this, several researchers are interested in developing therapeutic strategies for modulating the inflammatory process. Among these approaches, gene therapy was used to modulate inflammatory cytokines for the prevention of atherosclerosis [124]. Egashira and collaborators evaluated the use of gene therapy to block the activity of the monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) *in vivo* [125]. Moreover, the recruitment of monocytes has been reported to occur after the oxidation of low density lipoproteins (LDL) by free radicals [126]. Subsequently, LDL accumulates in macrophages and becomes atherogenic [127]. This oxidation promotes vascular dysfunction by: (i) exerting a direct cytotoxic effect on endothelial cells, (ii) increasing the chemotactic properties of monocytes, which in turn increases the proliferation of the macrophages and their transformation into foam cells, (iii) increasing the proliferation of the smooth muscle cells [128]. To protect LDL from oxidation and to target macrophages, a nanoparticles-based therapeutic approach was proposed [129]. It consisted of using the coenzyme Q10 (CoQ10), which displays an anti-atherogenic effect [130,131]. This study demonstrated a higher uptake of CoQ10 loaded nanoparticles by J-774 than unloaded ones. Another approach aiming at stabilizing the vulnerable plaque by reducing the rate of lipids and the number of macrophages has also been reported. This was achieved by intravenous injection of apolipoprotein-A1 gene in an adenoviral vector into mice, resulting in a transient increase in serum high density lipoprotein (HDL) [132]. As a consequence of the increase of HDL, the number and activity level of the macrophages decrease, and probably the occurrence of plaque rupture as well [133]. Alternatively, genes encoding for thrombolytic proteins or growth

promoters could be used to restore the antithrombic functions of endothelial cells, which have the capacity to inhibit the arterial thrombus formation [134].

After percutaneous coronary interventions (angioplasty or stent implantation), restenosis remains to be a problem in clinical cardiology. In this field, nanoparticle technology is regarded as a promising approach to deliver antiproliferative and anti-remodelling drugs at the site of injury. For this purpose, core-shell nanoparticles of PEG-based block copolymers for doxorubicin encapsulation were developed and have been shown to accumulate in vascular lesions with increased permeability [135]. Albumin nanoparticles were also used for loading paclitaxel, a potent antineoplastic drug. After systemic administration in rabbits, a dose-dependent reduction of neointimal growth has been observed [136].

3.5.3.2 Rheumatoid arthritis (RA)

One of the major cytokines that play a central role in the inflammatory process of RA is TNF- α , as shown in figure 3.5. RA is characterized by a chronic inflammation of the joint synovium where macrophages are activated and proliferate in an abnormal way, leading to the production of proinflammatory cytokines and metalloproteinases. Ultimately, these factors result in the formation and activation of osteoclasts, which has disastrous consequences for the bone and cartilage. In addition, the activation of monocytic lineage cells is not a phenomenon restricted to joints as it extends to the mononuclear phagocyte system. To diminish inflammation and to prevent irreversible joint damage, selective counteraction of macrophage activation seems to be an appropriate approach.

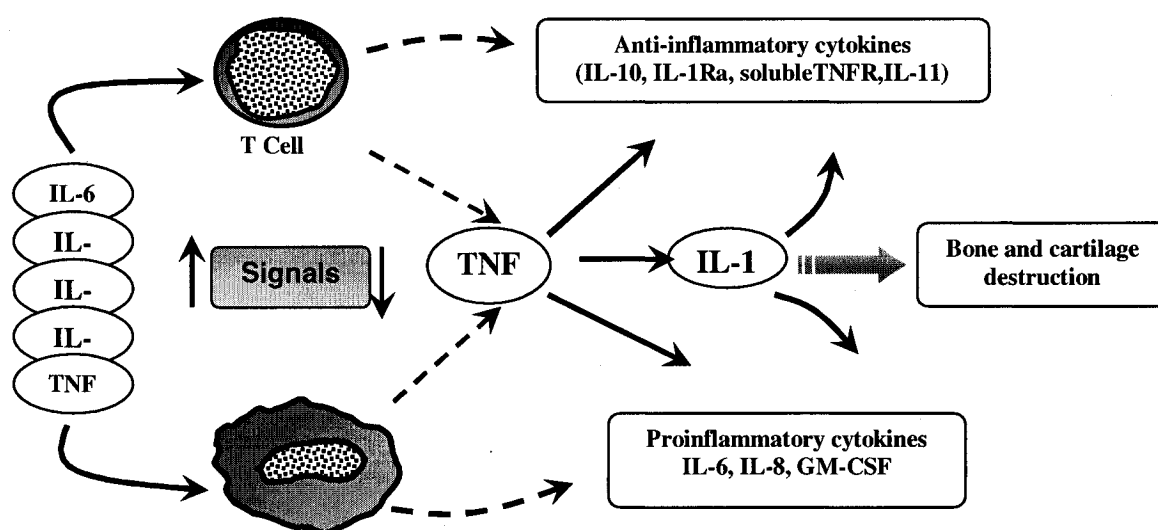


Figure 3.5 This simplified schematic representation illustrates the central role of TNF- α secreted by macrophages in rheumatoid arthritis (Adapted from reference [138]).

Some pathophysiological consequences can be explained, in part, by an inadequate apoptosis of macrophages. Accordingly, inducing their apoptosis could be considered as an interesting alternative [137]. Also, inhibition of the proinflammatory cytokines, such as TNF- α , has been suggested as a suitable approach to treating RA (reviewed in reference [138]). This factor is released early in the cascade and triggers a wide range of cellular events [139,140]; thus its inhibition could prevent its deleterious effects in several models of inflammation. Antisense-mediated inhibition of TNF synthesis *in vitro* has been demonstrated for various cell lines [141,142] and for human peripheral blood mononuclear cells [143]. Antisense oligonucleotides (ODN) could be used to specifically modify cellular gene expression; once bound, ODN either disables or induces the degradation of the target RNA. With more than 20 antisense drugs in clinical development, it appears that they will be important for the clinical therapy of a wide range of diseases; there is recent clinical evidence that antisense ODN may be used to treat infection (viruses and bacteria), tumors, and inflammation (reviewed in reference

[144]). The existence of specific cell surface receptors that bind ODN that are actively transported across the plasma membrane has been demonstrated [145,146].

To avoid the degradation of unmodified phosphodiester ODN by nucleases, which are ubiquitous in serum and in the intracellular milieu, various derivatives such as phosphorothioate (PO) have been developed [147]. However, the use of other strategies has been proven to be necessary to improve their cellular uptake and stability in nuclease-rich media. Some of methods consisted of ODN substitution by lipophilic molecules [148] and association with liposomes [149,150] or polycations [151]. Cationic lipids with unsaturated hydrocarbon chains, such as phosphatidyl-ethanolamine, can form a positively charged liposome and are effective at supporting transfection of the ODN. When ODNs are mixed with lipids, complexes form spontaneously due to electrostatic interactions and form a condensed and tight structure [152]. After endocytosis, the liposome causes a disruption of the endosomal membrane, resulting in the fusion and expulsion of ODN into the cytoplasm [153]. Following injection, oligo-liposome complexes were found in the circulation *in vivo* for up to 24 hours [154].

It has been suggested that ODN adsorption onto the nanoparticles is mediated by the formation of ion pairs between the negatively charged phosphate groups of the nucleic acid chain and the hydrophobic cations. The adsorption efficiency onto the nanoparticles was found to be highly dependent upon the ODN's chain length, nature of the cyanoacrylic monomer, hydrophobicity of the cations used as ion-pairing agents, and ionic concentration of the medium. Adsorption of ODN onto PACA nanoparticles was performed and seemed to increase their association with the cells [22,155,156], resulting in a significant inhibition of their enzymatic digestion and cellular uptake by different cell lines [157]. Following intravenous administration of ODN-based nanoparticles into mice, an investigation of the pharmacokinetic profile of ODN-nanoparticle association also showed an improvement of ODN stability [158]. Other formulations for ODN encapsulation using poly(isobutylcyanoacrylate) and poly(lactic acid) nanoparticles, rather than simple electrostatic adsorption, have also been developed [159,160].

Among other polymeric vehicles for ODN, polyethylenimines derivatives were found to have an effective protection against enzymatic degradation [161]. Using the emulsification-diffusion method [162], poly-(D,L-lactic acid) nanoparticles were synthesized and evaluated for the delivery of antisense ODN. Loading with 2.5 to 10% ODN allowed the production of nanoparticles with a size close to 300 nm. However, purification steps aiming to eliminate residual solvents resulted in a slight augmentation in the size of the ODN nanoparticles, and the effect was more pronounced as ODN loading was increased [160]. In another study by Arnedo et al., the authors explored the possibility of using albumin nanoparticles to carry PO-ODN that was adsorbed onto the surface or entrapped in the matrix. Enzymatic stability in the presence of phosphodiesterase was assayed for both systems and showed that when PO-ODN were adsorbed onto the surface of albumin nanoparticles, they degraded more rapidly than those entrapped in the matrix [163].

3.5.3.3 Neuroinflammatory diseases

Nanoparticles could also find an application in macrophage-mediated neuroinflammatory diseases. Due to their capacity to reach the central nervous system, circulating macrophages could act as carriers for therapeutic drug loaded nanoparticles, representing an exciting prospect for targeting therapies to treat neurological disorders [164].

The role of macrophages in the development of multiple sclerosis (MS), which is an inflammatory disease of the central nervous system (CNS), has been established. After their activation, they secrete an increased amount of nitric oxide (NO), which has neurotoxic effects and has been involved in the permeability of the blood brain barrier (BBB) [165,166]. In a study of experimental allergic encephalomyelitis (EAE), which serves as an animal model for MS, Brosnan et al. demonstrated that macrophage depletion can reduce the severity of the disease in a Lewis rat model [167]. Later on, in the same animal model, liposomes containing the drug dichloromethylene diphosphonate (Cl₂MDP) were used to eliminate macrophages. This treatment resulted in a complete

prevention of the clinical manifestations of EAE [168]. Five years later, the same group demonstrated that Cl_2MDP liposomes succeeded in eliminating the infiltrating macrophages but not the resident parenchymal microglia [169]. Therefore, even though microglia have been reported to play a major role in the development of EAE, infiltrating macrophages are needed for their activation, probably via the release of inflammatory mediators.

Since the permeability of the BBB is increased during MS, the passage of nanoparticulate systems could be facilitated. PACA nanoparticles have been investigated in EAE in order to determine their capacity to reach the CNS. Their concentration has been found to increase in the CNS, particularly in the white substance. This observation was correlated with the pathological condition where the BBB permeability is augmented. Long-term circulating PACA nanoparticles with PEG moieties were found in the CNS in greater amounts than non PEGylated PACA nanoparticles [170].

As for RA, the major role of $\text{TNF-}\alpha$ in the development and maintenance of inflammatory diseases is undoubted. For example, $\text{TNF-}\alpha$ has been shown to increase in the CNS during the peak of EAE disease and to decrease upon remission [171,172].

3.6 Conclusions

As discussed in this review, macrophages play a central role in mediating a wide range of inflammatory diseases, making them a good target for nanoparticle mediated therapies. The natural ability of macrophages to take up cell surface ligands is promising and encourages the development of specific nanoparticles that have appropriate surface modifications and anchoring entities to ensure their internalization *in vivo*. The major advantages in developing non-viral nanocarriers resides in their low toxicity, general applicability to most drugs, low cost, relative simplicity and possibility of large-scale production.

The design of clinically effective systems for macrophage mediated diseases depends on understanding the mechanisms that are involved in nanoparticle internalization by

macrophages as well as the relevant aspects of the internal machineries, such as the escape from the endosome. Controlling and tailoring the physicochemical aspects of colloidal systems and their behaviors in various conditions is also a key to success, particularly for the development of bio-inspired systems.

Macrophages possess a natural tendency to migrate into diseased tissues in response to signals such as cytokines. This ability is exploited by modifying macrophages and reintroducing them back in the bloodstream. Several studies have been performed using *ex vivo* modified macrophages for therapeutic purposes. Macrophages were activated *ex vivo* by exposure to treatments such as lipopolysaccharides (LPS), interferon (IFN) and medium conditioned by tumor cells. They were then reintroduced into tumor-bearing mice, resulting in an induction of tumor regression [173-175]. Successful therapy by reintroducing *ex vivo* manipulated macrophages depends on their ability to reach the diseased site. This may be affected by the route of administration [176,177]. A systemic administration versus local administration of *ex vivo* manipulated macrophages showed a variability in the results, which ranged from 0.2 to 28.8% [178,179].

The life-span of human macrophages has been estimated to be between one and three months [180], which could necessitate repeated treatments of the patients. Since systematic risk assessments of given nanoparticles are lacking, special attention is needed in this area before nanoparticles can be used for specific medical applications.

Another point to consider is the heterogeneity of monocytes and macrophages with respect to their phenotype and physiological properties (reviewed in reference [7]). Thus, understanding the macrophages' properties and recognition mechanisms, as well as their interactions with a specific system, is necessary before designing therapeutic nanoparticulate systems. Moreover, the long term effects of various nanoparticulate systems are not well known and have to be well assessed before moving further in their development and applications.

3.7 Acknowledgments

This work was supported in part by The Montreal Heart Institute Foundation. F. C. received a fellowship from MENTOR, a training program in mobility and posture disorders of Canadian Institutes of Health Research (CIHR). The authors would like to thank S. Tam for reviewing the manuscript.

3.8 References

1. Luo D, Saltzman WM. Synthetic DNA delivery systems. *Nature biotechnology* 2000;18:33-37.
2. Mainardes RM, Silva LP. Drug delivery systems: past, present, and future. *Curr Drug Targets* 2004;5:449-455.
3. Brannon-Peppas L, Blanchette JO. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 2004;56:1649-1659.
4. Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv. Drug Deliv Rev* 2002;54:631-651.
5. Ravi Kumar M, Hellermann G, Lockey RF, Mohapatra SS. Nanoparticle-mediated gene delivery: state of the art. *Expert Opin Biol Ther* 2004;4:1213-1224.
6. Rihova B. Immunomodulating activities of soluble synthetic polymer-bound drugs. *Adv Drug Deliv Rev* 2002;54:653-674.
7. Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Long-circulating and target specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev* 2001;53:283-318.
8. Sakuma S, Suzuki N, Sudo R, Hiwatari K, Kishida A, Akashi M. Optimized chemical structure of nanoparticles as carriers for oral delivery of salmon calcitonin. *Int J Pharm* 2002; 239:185-195.
9. Kreuter J. Influence of the surface properties on nanoparticle-mediated transport of drugs to the brain. *J Nanosci Nanotechnol* 2004;4:484-488.

10. Verdun C, Brasseur F, Vranckx H, Couvreur P, Roland M. Tissue distribution of doxorubicin associated with polyisohexylcyanoacrylate nanoparticles. *Cancer Chemother Pharmacol* 1990;26:13-18.
11. Moghimi SM, Szebeni J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Prog Lipid Res* 2003;42:463-478.
12. Illum L, Davis SS, Muller RH, Mak E, West P. The organ distribution and circulation time of intravenously injected colloidal carriers sterically stabilized with a block copolymer--poloxamine 908. *Life Sci* 1987;40:367-374.
13. Allen TM. Long-circulating (sterically stabilized) liposomes for targeted drug delivery. *Trends Pharmacol Sci* 1994;15:215-220.
14. Bazile D, Michalon JP, Prud'homme C, Spenlehauer G, Veillard M. nanoparticles having a prolonged reticulo-endothelial system capture rate. French Patent No. 08041, 1991.
15. Bazile D, Prud'homme C, Bassoullet MT, Marlard M, Spenlehauer G, Veillard M. Stealth Me.PEG-PLA nanoparticles avoid uptake by the mononuclear phagocytes system. *J Pharm Sci* 1995;84:493-498.
16. Vauthier C, Dubernet C, Fattal E, Pinto-Alphandary H, Couvreur P. Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55:519-548.
17. Couvreur P, Kante B, Roland M, Speiser P. Adsorption of antineoplastic drugs to polyalkylcyanoacrylate nanoparticles and their release in calf serum. *J Pharm Sci* 1979;68:1521-1524.
18. Douglas SJ, Davis SS, Illum L. Nanoparticles in drug delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1987;3:233-261.
19. Couvreur P. Polyalkylcyanoacrylates as colloidal drug carriers. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1988;5:1-20.

20. Gibaud S, Andreux JP, Weingarten C, Renard M, Couvreur P. Increased bone marrow toxicity of doxorubicin bound to nanoparticles. *Eur J Cancer* 1994;30A:820-826.
21. Damge C, Michel C, Aprahamian M, Couvreur P. New approach for oral administration of insulin with polyalkylcyanoacrylate nanocapsules as drug carrier. *Diabetes* 1988;37:246-251.
22. Chavany C, Le Doan T, Couvreur P, Puisieux F, Helene C. Polyalkylcyanoacrylate nanoparticles as polymeric carriers for antisense oligonucleotides. *Pharm Res* 1992;9:441-449.
23. Schwab G, Chavany C, Duroux I, Goubin G, Lebeau J, Helene C, Saison-Behmoaras T. Antisense oligonucleotides adsorbed to polyalkylcyanoacrylate nanoparticles specifically inhibit mutated Ha-ras-mediated cell proliferation and tumorigenicity in nude mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:10460-10464.
24. Soma CE, Dubernet C, Bentolila D, Benita S, Couvreur P. Reversion of multidrug resistance by co-encapsulation of doxorubicin and cyclosporin A in polyalkylcyanoacrylate nanoparticles. *Biomaterials* 2000;21:1-7.
25. Chiu YL, Ali A, Chu CY, Cao H, Rana TM. Visualizing a correlation between siRNA localization, cellular uptake, and RNAi in living cells. *Chem Biol* 2004;11:1165-1175.
26. Kakizawa Y, Furukawa S, Kataoka K. Block copolymer-coated calcium phosphate nanoparticles sensing intracellular environment for oligodeoxynucleotide and siRNA delivery. *J Control Release* 2004;97:345-356.
27. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001; 411: 494-498
28. Hammond SM, Caudy AA, Hannon GJ. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet* 2001;2:110-119.
29. McManus MT, Sharp PA. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet* 2002; 3:737-747.

30. Zhang W, Yang H, Kong X, Mohapatra S, Juan-Vergara HS, Hellermann G, Behera S, Singam R, Lockey RF, Mohapatra SS. Inhibition of respiratory syncytial virus infection with intranasal siRNA nanoparticles targeting the viral NS1 gene. *Nat Med* 2005;11:56-62.
31. Schiffelers RM, Ansari A, Xu J, Zhou Q, Tang Q, Storm G, Molema G, Lu PY, Scaria PV, Woodle MC. Cancer siRNA therapy by tumor selective delivery with ligand-targeted sterically stabilized nanoparticle. *Nucleic Acids Res* 2004;32:e149.
32. Leu D, Manthey B, Kreuter J, Speiser P, De Luca P. Distribution and elimination of coated polymethyl [2-¹⁴C]methacrylate nanoparticles after intravenous injection in rats. *J Pharm Sci* 1984;73:1433-1437.
33. Leroux JC, De Jaeghere F, Anner B, Doelker E, Gurny R. An investigation on the role of plasma and serum opsonins on the internalization of biodegradable poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by human monocytes. *Life Sci* 1995;57:695-703.
34. Peracchia MT, Harnisch S, Pinto-Alphandary H, Gulik A, Dedieu JC, Desmaele D, d'Angelo J, Muller RH, Couvreur P. Visualization of in vitro protein-rejecting properties of PEGylated stealth polycyanoacrylate nanoparticles. *Biomaterials* 1999;20:1269-1275.
35. Wagner E, Plank C, Zatloukal K, Cotten M, Birnstiel ML. Influenza Virus Hemagglutinin HA-2 N-Terminal Fusogenic Peptides Augment Gene Transfer by Transferrin-Polylysine-DNA Complexes: Toward a Synthetic Virus-Like Gene-Transfer Vehicle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:7934-7938.
36. Plank C, Oberhauser B, Mechtler K, Koch C, Wagner E. The influence of endosome-disruptive peptides on gene transfer using synthetic virus-like gene transfer systems. *J Biol Chem* 1994;269:12918-12924.
37. Panyam J, Zhou WZ, Prabha S, Sahoo SK, Labhasetwar V. Rapid endo-lysosomal escape of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery. *FASEB J* 2002;16:1217-1226.

38. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:7297-7301.
39. Pack DW, Putnam D, Langer R. Design of imidazole-containing endosomolytic biopolymers for gene delivery. *Biotechnol Bioeng* 2000;67:217-223.
40. East L, Isacke CM. The mannose receptor family. *Biochim Biophys Acta* 2002;1572:364-386.
41. Warr GA. A macrophage receptor for (mannose/glucosamine)-glycoproteins of potential importance in phagocytic activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1980;93:737-745.
42. Cui Z, Hsu CH, Mumper RJ. Physical characterization and macrophage cell uptake of mannan-coated nanoparticles. *Drug Dev Ind Pharm*. 2003;29:689-700.
43. Steinman RM, Mellman IS, Muller WA, Cohn ZA. Endocytosis and the recycling of plasma membrane. *J Cell Biol* 1983;96:1-27.
44. Lennartz MR, Wileman TE, Stahl PD. Isolation and characterization of a mannose-specific endocytosis receptor from rabbit alveolar macrophages. *Biochem J* 1987;245:705-711.
45. Haltiwanger RS, Hill RL. The isolation of a rat alveolar macrophage lectin. *J Biol Chem* 1986;261:7440-7444.
46. Ii M, Wada M, Kawasaki T, Yamashina I. Isolation and characterization of lectins specific for mannose/fucose/N-acetylglucosamine from rat peritoneal macrophages. *J Biochem (Tokyo)* 1988;104:587-590.
47. Stahl P, Schlesinger PH, Sigardson E, Rodman JS, Lee YC. Receptor-mediated pinocytosis of mannose glycoconjugates by macrophages: characterization and evidence for receptor recycling. *Cell* 1980;19:207-215.
48. Largent BL, Walton KM, Hoppe CA, Lee YC, Schnaar RL. Carbohydrate-specific adhesion of alveolar macrophages to mannose-derivatized surfaces. *J Biol Chem* 1984;259:1764-1769.

49. Henry-Toulme N, Grouselle M, Ramaseilles C. Multidrug resistance bypass in cells exposed to doxorubicin-loaded nanospheres. Absence of endocytosis. *Biochem Pharmacol* 1995;50:1135-1139.
50. Li S, Huang L. In vivo gene transfer via intravenous administration of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes. *Gene Ther* 1997; 4:891-900.
51. Li S, Rizzo MA, Bhattacharya S, Huang L. Characterization of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes for intravenous gene delivery. *Gene Ther* 1998;5:930-937.
52. Avrameas A, McIlroy D, Hosmalin A, Autran B, Debre P, Monsigy M, Roche AC, Midoux P. Expression of a mannose/fucose membrane lectin on human dendritic cells. *Eur J Immunol* 1996;26:394-400.
53. Cui Z, Han SJ, Huang L. Coating of mannan on LPD particles containing HPV E7 peptide significantly enhances immunity against HPV-positive tumor. *Pharm Res* 2004;21:1018-1025.
54. Hattori Y, Kawakami S, Suzuki S, Yamashita F, Hashida M. Enhancement of immune responses by DNA vaccination through targeted gene delivery using mannosylated cationic liposome formulations following intravenous administration in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 317:992-999.
55. Kolb-Bachofen V, Abel F. Participation of D-galactose-specific receptors of liver macrophages in recognition of fibronectin-opsonized particles. *Carbohydr Res* 1991;213:201-213.
56. Kobzik L. Lung macrophage uptake of unopsonized environmental particulates. Role of scavenger-type receptors. *J Immunol* 1995;155:367-376.
57. Dunne DW, Resnick D, Greenberg J, Krieger M, Joiner KA. The type I macrophage scavenger receptor binds to gram-positive bacteria and recognizes lipoteichoic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:1863-1867.
58. Krieger M, Acton S, Ashkenas J, Pearson A, Penman M, Resnick D. Molecular flypaper, host defense, and atherosclerosis. Structure, binding properties, and functions of macrophage scavenger receptors. *J Biol Chem* 1993;268:4569-4572.

59. Yamada Y, Doi T, Hamakubo T, and Kodama T. Scavenger receptor family proteins: role for atherosclerosis, host defence and disorders of the central nervous system. *Cell Mol Life Sci* 1998;54:628-640.
60. Raynal I, Prigent P, Peyramaure S, Najid A, Rebuzzi C, Corot C. Macrophage Endocytosis of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: Mechanisms and Comparison of Ferumoxides and Ferumoxtran-10. *Investigative Radiology* 2004;39:56-63.
61. Camner P, Lundborg M, Lastbom L, Gerde P, Gross N, Jarstrand C. Experimental and calculated parameters on particle phagocytosis by alveolar macrophages. *J Appl Physiol* 2002;92:2608-2616.
62. Sutterwala FS, Rosenthal LA, Mosser DM. Cooperation between CR1 (CD35) and CR3 (CD 11b/CD18) in the binding of complement-opsonized particles. *J Leukoc Biol* 1996;59:883-890.
63. Krauss JC, Poo H, Xue W, Mayo-Bond L, Todd RF 3rd, Petty HR. Reconstitution of antibody-dependent phagocytosis in fibroblasts expressing Fc gamma receptor IIIB and the complement receptor type 3. *J Immunol* 1994;153:1769-1777.
64. Chronos Z, Shepherd VL. Differential regulation of the mannose and SP-A receptors on macrophages. *Am J Physiol* 1995; 269:L721-L726.
65. Zambaux MF, Faivre-Fiorina B, Bonneau F, Marchal S, Merlin JL, Dellacherie E, Labrude P, Vigneron C. Involvement of neutrophilic granulocytes in the uptake of biodegradable non-stealth and stealth nanoparticles in guinea pig. *Biomaterials* 2000;21:975-980.
66. Gibaud S, Demoy M, Andreux JP, Weingarten C, Gouritin B, Couvreur P. Cells involved in the capture of nanoparticles in hematopoietic organs. *J Pharm Sci* 1996;85:944-950.
67. Van Oss CJ, Gillman CF, Newmann AW. *Phagocytic Engulfment and Cell Adhesiveness*, Marcel Decker, New York, 1975.

68. Labhasetwar V, Song C, Humphrey W, Shebuski R, Levy RJ. Arterial Uptake of Biodegradable Nanoparticles: Effect of Surface Modifications. *J Pharm Sci* 1998;87:1229-1234.
69. Tabata Y, Ikada Y. Effect of the size and surface charge of polymer microspheres on their phagocytosis by macrophage. *Biomaterials* 1988;9:356-362.
70. Blunk T, Hochstrasser D F, Sanchez JC, Müller BW, Müller RH. Colloidal carriers for intravenous drug targeting: plasma protein adsorption patterns on surface-modified latex particles evaluated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis* 1993;14:1382-1387.
71. Gessner A, Waicz R, Lieske A, Paulke B, Mader K, Muller RH. Nanoparticles with decreasing surface hydrophobicities: influence on plasma protein adsorption. *Int J Pharm* 2000;196:245-249.
72. Bocca C, Caputo O, Cavalli R, Gabriel L, Miglietta A, Gasco MR. Phagocytic uptake of fluorescent stealth and non stealth solid lipid nanoparticles. *Int J Pharm* 1998;175:185-193.
73. Lourenco C, Teixeira M, Simões S, Gaspar R. Steric stabilization of nanoparticles: Size and surface properties. *Int J Pharm* 1996; 138:1-12.
74. Fontana G, Licciardi M, Mansueto S, Schillaci D, Giammona G. Amoxicillin-loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles: influence of PEG coating on the particle size, drug release rate and phagocytic uptake. *Biomaterials* 2001;22:2857-2865.
75. Roseman S. The synthesis of complex carbohydrates by multiglycosyltransferase systems and their potential function in intercellular adhesion. *Chem Phys Lipids* 1970;5:270-297.
76. Pricer WE Jr, Ashwell G. The binding of desialylated glycoproteins by plasma membranes of rat liver. *J Biol Chem* 1971;246:4825-4833.
77. Gallagher JE, George G, Brody AR. Sialic acid mediates the initial binding of positively charged inorganic particles to alveolar macrophage membranes. *Am Rev Respir Dis* 1987;135:1345-1352.

78. Gbadamosi JK, Hunter AC, Moghimi SM. PEGylation of microspheres generates a heterogeneous population of particles with differential surface characteristics and biological performance. *FEBS Lett* 2002;532:338-344.
79. Roser M, Fischer D, Kissel T. Surface-modified biodegradable albumin nano- and microspheres. II: effect of surface charges on in vitro phagocytosis and biodistribution in rats. *Eur J Pharm Biopharm* 1998;46:255-263.
80. Wilhelm C, Gazeau F, Roger J, Pons J-N, Bacri J-C. Interaction of anionic superparamagnetic nanoparticles with cells: kinetic analyses of membrane adsorption and subsequent internalization. *Langmuir* 2002;18:8148-8155.
81. Wilhelm C, Billotey C, Roger J, Pons J-N, Bacri J-C, Gazeau F. Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. *Biomaterials* 2003;24:1001-1011.
82. Billotey C, Wilhelm C, Devaud M, Bacri JC, Bittoun J, Gazeau F. Cell internalization of anionic maghemite nanoparticles: quantitative effect on magnetic resonance imaging. *Magn Reson Med* 2003;49:646-654.
83. Coester CJ, Langer K, van Briesen H, Kreuter J. Gelatin nanoparticles by two step desolvation--a new preparation method, surface modifications and cell uptake. *J Microencapsul* 2000;17:187-193.
84. Gibaud S, Weingarten C, Andreux JP, Couvreur P. [Targeting bone marrow with the help of polyalkylcyanoacrylate nanoparticles] *Ann Pharm Fr* 1999;57:324-331.
85. Cruz T, Gaspar R, Donato A, Lopes C. Interaction between polyalkylcyanoacrylate nanoparticles and peritoneal macrophages: MTT metabolism, NBT reduction, and NO production. *Pharm Res* 1997;14:73-79.
86. Elferink JG. Cytolytic effect of polylysine on rabbit polymorphonuclear leukocytes. *Inflammation* 1985;9:321-331.
87. Clark RA, Olsson I, Klebanoff SJ. Cytotoxicity for tumor cells of cationic proteins from human neutrophil granules. *J Cell Biol* 1976;70:719-723.

88. Putnam D, Gentry CA, Pack DW, Langer R. Polymer-based gene delivery with low cytotoxicity by a unique balance of side-chain termini. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:1200-1205.
89. Wolfert MA, Seymour LW. Atomic force microscopic analysis of the influence of the molecular weight of poly(L)lysine on the size of polyelectrolyte complexes formed with DNA. *Gene Ther* 1996;3:269-273.
90. Scholer N, Hahn H, Muller RH, Liesenfeld O. Effect of lipid matrix and size of solid lipid nanoparticles (SLN) on the viability and cytokine production of macrophages. *Int J Pharm* 2002;231:167-176.
91. Olbrich C, Scholer N, Tabatt K, Kayser O, Muller RH. Cytotoxicity studies of Dynasan 114 solid lipid nanoparticles (SLN) on RAW 264.7 macrophages-impact of phagocytosis on viability and cytokine production. *J Pharm Pharmacol* 2004;56:883-891.
92. Scholer N, Zimmermann E, Katzfey U, Hahn H, Muller RH, Liesenfeld O. Preserved solid lipid nanoparticles (SLN) at low concentrations do cause neither direct nor indirect cytotoxic effects in peritoneal macrophages. *Int J Pharm* 2000;196:235-239.
93. Rodrigues JM Jr, Bories C, Emery I, Fessi H, Devissaguet JP, Liance M. Development of an injectable formulation of albendazole and in vivo evaluation of its efficacy against *Echinococcus multilocularis* metacestode. *Int J Parasitol* 1995;25:1437-1441.
94. Chellat F, Grandjean-Laquerriere A, Le Naour R, Fernandes J, Yahia L'H, Guenounou M, Laurent-Maquin D. Metalloproteinase and cytokine production by THP-1 macrophages following exposure to chitosan-DNA nanoparticles. *Biomaterials* 2005;26:961-970.
95. Gaspar R, Preat V, Oppendoes FR, Roland M. Macrophage activation by polymeric nanoparticles of polyalkylcyanoacrylates: activity against intracellular *Leishmania donovani* associated with hydrogen peroxide production. *Pharm Res* 1992;9:782-987.

96. Lowery MM, Greenberger PA. Amphotericin-induced stridor: a review of stridor, amphotericin preparations, and their immunoregulatory effects. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2003;91:460-466.
97. Chia JK, Pollack M. Amphotericin B induces tumor necrosis factor production by murine macrophages. *J Infect Dis* 1989;159:113-116.
98. Cleary JD, Chapman SW, Nolan RL. Pharmacologic modulation of interleukin-1 expression by amphotericin B-stimulated human mononuclear cells. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:977-981.
99. Gelfand JA, Kimball K, Burke JK, Dinarello CA. Amphotericin B treatment of human mononuclear cells in vitro results in secretion of tumor necrosis factor and interleukin-1. *Clin Res* 1988;36:456A.
100. Espuelas MS, Legrand P, Loiseau PM, Bories C, Barratt G, Irache JM. In vitro antileishmanial activity of amphotericin B loaded in poly(epsilon-caprolactone) nanospheres. *J Drug Target* 2002;10:593-599.
101. Sarkar S, Mandal S, Sinha J, Mukhopadhyay S, Das N, Basu MK. Quercetin: critical evaluation as an antileishmanial agent in vivo in hamsters using different vesicular delivery modes. *J Drug Target* 2002;10:573-578.
102. Zhang Q, Liao GT, Wei DP, Zhang CJ. [Increase of gentamicin uptake in cultured mouse peritoneal macrophage and rat hepatocytes when used in the form of nanoparticles] *Yao Xue Xue Bao* 1996;31:375-80.
103. Rodrigues JM Jr, Croft SL, Fessi H, Bories C, Devissaguet JP. The activity and ultrastructural localization of primaquine-loaded poly (d,l-lactide) nanoparticles in *Leishmania donovani* infected mice. *Trop Med Parasitol* 1994;45:223-228.
104. Gaspar R, Oppendoes FR, Preat V, Roland M. Drug targeting with polyalkylcyanoacrylate nanoparticles: in vitro activity of primaquine-loaded nanoparticles against intracellular *Leishmania donovani*. *Ann Trop Med Parasitol* 1992;86:41-49.

105. Skidan IN, Gel'perina SE, Severin SE, Guliaev AE. [Enhanced activity of rifampicin loaded with polybutyl cyanoacrylate nanoparticles in relation to intracellularly localized bacteria] *Antibiot Khimioter* 2003;48:23-26.
106. Forestier F, Gerrier P, Chaumard C, Quero AM, Couvreur P, Labarre C. Effect of nanoparticle-bound ampicillin on the survival of *Listeria monocytogenes* in mouse peritoneal macrophages. *J Antimicrob Chemother* 1992;30:173-179.
107. Balland O, Pinto-Alphandary H, Viron A, Puvion E, Andreumont A, Couvreur P. Intracellular distribution of ampicillin in murine macrophages infected with *Salmonella typhimurium* and treated with (3H) ampicillin-loaded nanoparticles. *J Antimicrob Chemother* 1996;37:105-115.
108. Pinto-Alphandary H, Balland O, Laurent M, Andreumont A, Puisieux F, Couvreur P. Intracellular visualization of ampicillin-loaded nanoparticles in peritoneal macrophages infected in vitro with *Salmonella typhimurium*. *Pharm Res* 1994;11:38-46.
109. Deniau M, Durand R, Bories C, Paul M, Astier A, Couvreur P, Houin R. [In vitro study of leishmanicidal agents with drug carriers] *Ann Parasitol Hum Comp* 1993;68:34-37.
110. Alving CR. Macrophages as target for delivery of liposomes encapsulated antimicrobial agents. *Adv Drug Del Rev* 1988;2:107-128.
111. Bender A, Schfer V, Steffan AM, Royer C, Kreuter J, Rubsamen-Waigmann H, von Briesen H. Inhibition of HIV in vitro by antiviral drug-targeting using nanoparticles. *Res Virol* 1994;145:215-220.
112. Lobenberg R, Araujo L, von Briesen H, Rodgers E, Kreuter J. Body distribution of azidothymidine bound to hexyl-cyanoacrylate nanoparticles after i.v. injection to rats. *J Control Release* 1998;50:21-30.
113. Lobenberg R, Kreuter J. Macrophage targeting of azidothymidine: a promising strategy for AIDS therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996;12:1709-1715.
114. Schafer V, von Briesen H, Andreesen R, Steffan AM, Royer C, Troster S, Kreuter J, Rubsamen-Waigmann H. Phagocytosis of nanoparticles by human

- immunodeficiency virus (HIV)-infected macrophages: a possibility for antiviral drug targeting. *Pharm Res* 1992;9:541-546.
115. Bender AR, von Briesen H, Kreuter J, Duncan IB, Rubsamen-Waigmann H. Efficiency of nanoparticles as a carrier system for antiviral agents in human immunodeficiency virus-infected human monocytes/macrophages in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:1467-1471.
 116. Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 2001;104: 365-372.
 117. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-126.
 118. Rollins BJ. Chemokines. *Blood* 1997; 90: 909-928.
 119. Moreno PR, Falk E, Palacios IF, Newell JB, Fuster V, Fallon JT. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes: implications for plaque rupture. *Circulation* 1994;90:775-778.
 120. Jiang Y, Beller DI, Frenzl G, Graves DT. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J Immunol* 1992;148:2423-2428.
 121. Lu B, Rutledge BJ, Gu L, Fiorillo J, Lukacs NW, Kunkel SL, North R, Gerard C, Rollins BJ. Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J Exp Med* 1998;187:601-608.
 122. Yamamoto T, Eckes B, Mauch C, Hartmann K, Krieg T. Monocyte chemoattractant protein-1 enhances gene expression and synthesis of matrix metalloproteinase-1 in human fibroblasts by an autocrine IL-1 α -loop. *J Immunol* 2000;164:6174-6179.
 123. McEver RP, Cummings RD. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J Clin Invest* 1997;100:S97-S103.
 124. Ito T, Ikeda U. Inflammatory cytokines and cardiovascular disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2003;2:257-265.

125. Egashira K, Koyanagi M, Kitamoto S, Ni W, Kataoka C, Morishita R, Kaneda Y, Akiyama C, Nishida KI, Sueishi K, Takeshita A. Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy inhibits vascular remodeling in rats: blockade of MCP-1 activity after intramuscular transfer of a mutant gene inhibits vascular remodeling induced by chronic blockade of NO synthesis. *Faseb J* 2000;14:1974-1978.
126. Glass C.K. and Witztum J.L. Atherosclerosis, the road ahead. *Cell* 2001;104:503-516.
127. Hegyi L, Hardwick SJ, Siow RC, Skeppe JN. Macrophage death and the role of apoptosis in human atherosclerosis. *J Hematother Stem Cell Res* 2001;10:27-42.
128. Stocker R, Keaney JF Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004;84:1381-1478.
129. Hsu CH, Cui Z, Mumper RJ, Jay M. Preparation and characterization of novel coenzyme Q10 nanoparticles engineered from microemulsion precursors. *AAPS PharmSciTech* 2003;4:E32.
130. Witting PK, Pettersson K, Letters J, Stocker R. Anti- atherogenic effect of coenzyme Q10 in apolipoprotein E gene knockout mice. *Free Radic Biol Med* 2000;29:295-305.
131. Raitakari OT, McCredie RJ, Witting P, Griffiths KA, Letters J, Sullivan D, Stocker R, Celemajer DS. Coenzyme Q improves LDL resistance to in vivo oxidation but does not enhance endothelial function in hypercholesterolemic young adults. *Free Radic Biol Med* 2000;28:1100-1105.
132. Kopfler WP, Willard M, Betz T, Willard JE, Gerard RD, Meidell RS. Adenovirus-mediated transfer of a gene encoding human apolipoprotein A-I into normal mice increases circulating high-density lipoprotein cholesterol. *Circulation* 1994;90:1319-1327.
133. Fuster V. Elucidation of the role of plaque instability and rupture in acute coronary events. *Am J Cardiol* 1995;76:24C-33C.
134. Feldman LJ, Isner JM. Gene therapy for the vulnerable plaque. *J Am Coll Cardiol* 1995;26:826-835.

135. Uwatoku T, Shimokawa H, Abe K, Matsumoto Y, Hattori T, Oi K, Matsuda T, Kataoka K, Takeshita A. Application of nanoparticle technology for the prevention of restenosis after balloon injury in rats. *Circ Res* 2003;92:e62-e69.
136. Kolodgie FD, John M, Khurana C, Farb A, Wilson PS, Acampado E, Desai N, Soon-Shiong P, Virmani R. Sustained reduction of in-stent neointimal growth with the use of a novel systemic nanoparticle paclitaxel. *Circulation* 2002;106:1195-1198.
137. Rabinovich GA. Apoptosis as a target for gene therapy in rheumatoid arthritis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000;95:225-233.
138. Feldmann M. Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:364-371.
139. Beutler B, Cerami A. The biology of cachectin/TNF--a primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol* 1989;7:625-655.
140. Leeper-Woodford SK, Carey PD, Byrne K, Jenkins JK, Fisher BJ, Blocher C, Sugerman HJ, Fowler AA 3rd. Tumor necrosis factor. Alpha and beta subtypes appear in circulation during onset of sepsis-induced lung injury. *Am Rev Respir Dis* 1991;143:1076-1082.
141. Taylor MF, Paulauskis JD, Weller DD, Kobzik L. In vitro efficacy of morpholino-modified antisense oligomers directed against tumor necrosis factor- α mRNA. *J Biol Chem* 1996;271:17445-17452.
142. Mayne M, Ni W, McKenna R, Power C. Antisense oligodeoxynucleotides targeting internal exon sequences efficiently regulate TNF- α expression. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 1999;9:135-144.
143. Hartmann G, Krug A, Eigler A, Moeller J, Murphy J, Albrecht R, Endres S. Specific suppression of human tumor necrosis factor- α synthesis by antisense oligodeoxynucleotides. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 1996;6:291-299.
144. Crooke ST. Progress in antisense technology. *Annu Rev Med* 2004;55:61-95.

145. Yakubov LA, Deeva EA, Zarytova VF, Ivanova EM, Ryte AS, Yurchenko LV, Vlassov VV. Mechanism of oligonucleotide uptake by cells: involvement of specific receptors? *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:6454-6458.
146. Loke SL, Stein CA, Zhang XH, Mori K, Nakanishi M, Subasinghe C, Cohen JS, Neckers LM. Characterization of oligonucleotide transport into living cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:3474-3478.
147. Dean NM, McKay R. Inhibition of protein kinase C- α expression in mice after systemic administration of phosphorothioate antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:11762-11766.
148. Letsinger R, Zhang G, Sun DK, Ikeuchi T and Sarin PS, Cholesterol-conjugated oligonucleotides: Synthesis, properties and activity as inhibitors of replication of human immunodeficiency virus in cell culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:6553-6556.
149. Akhtar S, Basu S, Wickstrom E, Juliano RL. Interactions of antisense DNA oligonucleotide analogs with phospholipids membranes (liposomes). *Nucleic Acids Res* 1991;19:5551-5559.
150. Morishita R, Gibbons GH, Kaneda Y, Ogihara T, Dzau VJ. Pharmacokinetics of antisense oligodeoxyribonucleotides (cyclin B, and CDC 2 kinase) in the vessel wall in vivo: Enhanced therapeutic utility for restenosis by HVJ-liposome delivery. *Gene* 1994;149:13-19.
151. Leonetti JP, Degols G and Lebleu B, Biological activity of oligonucleotide poly(L-lysine) conjugates: Mechanism of cell uptake. *Bioconjug Chem* 1990;1:149-153.
152. Gershon H, Ghirlando R, Guttman SB, Minsky A. Mode of formation and structural features of DNA-cationic liposome complexes used for transfection. *Biochemistry* 1993;32:7143-7151.
153. Zelphati O, Szorka Jr FC. Mechanism of oligonucleotides release from cationic liposomes. *PNAS USA* 1996;93:11493-11498.

154. Litzinger DC, Brown JM, Wala L, Kaufman SA, Van GY, Farrell CL, Collins D. Fate of cationic liposomes and their complex with oligonucleotide in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1996;1281:139-149.
155. Lambert G, Fattal E, Brehier A, Feger J, Couvreur P. Effect of polyisobutylcyanoacrylate nanoparticles and lipofectin loaded with oligonucleotides on cell viability and PKC alpha neosynthesis in HepG2 cells. *Biochimie* 1998;80:969-976.
156. Zobel HP, Junghans M, Maienschein V, Werner D, Gilbert M, Zimmermann H, Noe C, Kreuter J, Zimmer A. Enhanced antisense efficacy of oligonucleotides adsorbed to monomethylaminoethylmethacrylate methylmethacrylate copolymer nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm* 2000;49:203-210.
157. Zimmer A. Antisense oligonucleotide delivery with polyhexylcyanoacrylate nanoparticles as carriers. *Methods* 1999;18:286-295.
158. Fattal E, Vauthier C, Aynie I, Nakada Y, Lambert G, Malvy C, Couvreur P. Biodegradable polyalkylcyanoacrylate nanoparticles for the delivery of oligonucleotides. *J Control Release* 1998;53:137-143.
159. Lambert G, Fattal E, Pinto-Alphandary H, Gulik A, Couvreur P. Polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules containing an aqueous core for the delivery of oligonucleotides. *Int J Pharm* 2001;214:13-16.
160. Berton M, Allemann E, Stein CA, Gurny R. Highly loaded nanoparticulate carrier using an hydrophobic antisense oligonucleotide complex. *Eur J Pharm Sci* 1999;9:163-170.
161. Brus C, Petersen H, Aigner A, Czubayko F, Kissel T. Efficiency of polyethylenimines and polyethylenimine-graft-poly (ethylene glycol) block copolymers to protect oligonucleotides against enzymatic degradation. *Eur J Pharm Biopharm* 2004;57:427-430.
162. Leroux JC, Allemann E, Doelker E, Gurny R. New approach for the preparation of nanoparticles by an emulsification-diffusion method. *Eur J Pharm Biopharm* 1995;41:14-18.

163. Arnedo A, Espuelas S, Irache JM. Albumin nanoparticles as carriers for a phosphodiester oligonucleotide. *Int J Pharm* 2002;244:59-72.
164. Merodio M, Irache JM, Eclancher F, Mirshahi M, Villarroya H. Distribution of albumin nanoparticles in animals induced with the experimental allergic encephalomyelitis. *J Drug Target* 2000;8:289-303.
165. Misko TP, Trotter JL, Cross AH. Mediation of inflammation by encephalitogenic cells: interferon gamma induction of nitric oxide synthase and cyclooxygenase 2. *J Neuroimmunol* 1995;61:195-204.
166. Benveniste EN. Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. *J Mol Med* 1997;75:165-173.
167. Brosnan CF, Bornstein MB, Bloom BR. The effects of macrophage depletion on the clinical and pathologic expression of experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 1981;126:614-620.
168. Huitinga I, van Rooijen N, de Groot CJA, Uitdehaag BMJ, Dijkstra CD. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis in lewis rats after elimination of macrophages. *J Exp Med* 1990;172:1025-1033.
169. Bauer J, Huitinga I, Zhao W, Lassmann H, Hickey WF, Dijkstra CD. The role of macrophages, perivascular cells, and microglial cells in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia* 1995;15:437-446.
170. Calvo P, Gouritin B, Villarroya H, Eclancher F, Giannavola C, Klein C, Andreux JP, Couvreur P. Quantification and localization of PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles in brain and spinal cord during experimental allergic encephalomyelitis in the rat. *Eur J Neurosci* 2002;15:1317-1326.
171. Khoury SJ, Hancock WW, Weiner HL. Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with downregulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of transforming growth factor β , interleukin 4, and prostaglandin E expression in the brain. *J Exp Med* 1992;176:1355-1364.

172. Renno T, Krakowski M, Piccirillo C, Lin J-Y, Owens T. TNF- α expression by resident microglia and infiltrating leukocytes in the central nervous system of mice with experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 1995;154:944-953.
173. Fidler I J. Inhibition of pulmonary metastasis by intravenous injection of specifically activated macrophages. *Cancer Res* 1974;34:1074-1078.
174. Fidler I J. Therapy of cancer metastasis by systemic activation of macrophages. *Adv. Pharmacol* 1994;30:271-326.
175. Ben-Efraim S, Tak C, Romijn JC, Fieren MJ, Bonta IL. Therapeutical effect of activated human macrophages on a human tumor line growing in nude mice. *Med Oncol* 1994;11:7-12.
176. Andreesen R, Hennemann B, Krause SW. Adoptive immunotherapy of cancer using monocyte-derived macrophages: rationale, current status, and perspectives. *J Leukoc Biol* 1998;64:419-426.
177. Saika T, Satoh T, Kusaka N, Ebara S, Mouraviev VB, Timme TL, Thompson TC. Route of administration influences the antitumor effects of bone marrow-derived dendritic cells engineered to produce interleukin-12 in a metastatic mouse prostate cancer model. *Cancer Gene Ther* 2004;11:317-324.
178. Audran R, Collet B, Moisan A, Toujas L. Fate of mouse macrophages radiolabelled with PKH-95 and injected intravenously. *Nucl Med Biol* 1995;22:817-821.
179. Chokri M, Lallot C, Ebert M, Poindron P, Batholeyns J. Biodistribution of indium-labelled macrophages in mice bearing solid tumors. *Int J Immunol* 1990;1:79-84.
180. Thomas ED, Ramberg RE, Sale GE, Sparkes RS, Golde DW. Direct evidence for a bone marrow origin of the alveolar macrophage in man. *Science* 1976;192:1016-1018.

CHAPITRE IV

4. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le projet de doctorat a consisté à mettre au point des nanoparticules polymériques pour véhiculer des acides nucléiques (plasmide avec gènes et oligonucléotides) aux macrophages.

Nous présentons ici les différentes techniques et approches utilisées lors des expérimentations.

4.1 Effet de l'internalisation des nanoparticules

4.1.1 Préparation des nanoparticules de Ch-ADN

Le chitosan utilisé pour la préparation des nanoparticules est de poids moléculaire de 400 kDa (Fluka Biokemica, Buchs, Switzerland) avec un degré de déacétylation de 82%.

L'ADN est un plasmide VR1412 qui possède un gène rapporteur qui code pour la protéine β -galactosidase, sous le contrôle du promoteur CMV (VICAL Inc., San Diego, CA, USA).

Les nanoparticules ont été préparées en se basant sur la méthode de Mao et al. (2001).

- Tout d'abord, une solution stock de 0.1% est préparée en dissolvant le chitosane dans un tampon d'acétate de sodium 5 mM à un pH de 5.5. La solution est alors passée à travers un filtre de 0.22 μ m pour la stériliser.
- Une solution contenant le plasmide (100 μ g/mL) est préparée en utilisant le sulfate de sodium (Na_2SO_4) stérilisé par filtration, à une concentration de 4.3 mM.

- 100 μ l de chaque solution (chitosane et ADN) sont mélangés par vortexage dans un même tube, sous conditions stériles, suite à un préchauffage à 55°C.

L'analyse en microscopie à force atomique (MFA) (Topometrix TMX 2010, pointe pyramidale Si_3N_4 , en mode contact) a permis de révéler que la taille moyenne des nanoparticules obtenues est de 75 nm (Figure 4.1).

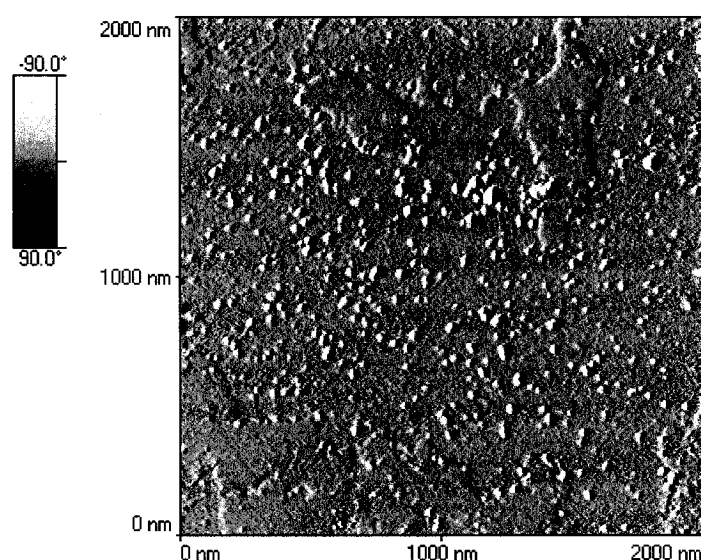


Figure 4.1 Nanoparticules à base de chitosane et ADN observées en MFA

4.1.2. Marquage des nanoparticules

Les nanoparticules sont marquées par la fluorescéine-5-isothiocyanate (FITC) (Molecular probes Inc., USA), en marquant le chitosane qui est, par la suite, complexé avec l'ADN.

Le marquage est réalisé en suivant les procédures de la compagnie.

- 1 mL DMSO est rajouté dans 10 mg de FITC (directement dans la fiole de FITC);
- Le mélange est vortexé pendant 5-10 secondes;
- 100 μ l de la solution de chitosane y est ajouté;

- Le mélange est vortexé à faible vitesse pendant 75 minutes;
- Par la suite, le chitosane est précipité dans 5 mL d'hydroxyde de sodium (NaOH) pH 8 puis filtré et centrifugé à 2500 rpm, pendant 10 minutes;
- Par la suite, il est procédé à plusieurs lavages avec de l'eau stérile et ultracentrifugation
- Le culot est resuspendu dans du tampon acétate filtré (0.34mL d'acide acétique et 1.915g acétate de sodium, dans 100 mL d'eau déionisée).
- Cette solution de chitosane marqué sert alors à préparer les nanoparticules tel que décrit dans la section ci-dessus.

4.1.3. Culture cellulaire

La lignée de macrophages humains THP-1 (American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD), a été choisie pour les études à cause de son activité phagocytaire. Les cellules sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 contenant 10% de sérum de veau fœtal (Gibco, BRL) inactivé par chauffage (1 h à 56°C). La L-Glutamine 2 mM, la pénicilline (100 units/mL), la streptomycine (100 ng/mL) et le 2-mercaptoéthanol à $5 \cdot 10^{-5}$ M (Sigma, St Louis, MO, USA) sont rajoutés au milieu.

4.1.4 Étude de l'internalisation des nanoparticules par les macrophages

4.1.4.1 Cytométrie en flux

L'internalisation des nanoparticules marquées par le FITC est évaluée par cytométrie en flux, suite à leur incubation avec les macrophages pendant 1, 6 et 24 heures. À la fin de chaque période, les cellules sont centrifugées, lavées 3 fois avec du PBS et fixées dans 500 µl du même tampon contenant 1% de paraformaldéhyde. Le cytomètre en flux

Beckman Coulter a été utilisé pour ces études permettant ainsi d'évaluer la proportion des cellules qui ont internalisé les nanoparticules.

4.1.4.2 Microscopie à fluorescence

Pour la visualisation des nanoparticules dans les macrophages, un microscope à fluorescence (Zeiss-Axiophot) est utilisé.

Pour cette étude, la même procédure que pour la cytométrie en flux est effectuée. Après fixation des cellules, celles-ci sont centrifugées puis une partie du culot est étalée sur une lame recouverte d'une lamelle puis visualisée au microscope à fluorescence.

4.1.5 - Réaction des macrophages aux nanoparticules

Différentes concentrations de nanoparticules (basées sur la teneur en ADN plasmidique) sont mises en contact direct avec les macrophages. Après différentes périodes d'incubation (1-72 heures, dépendamment des tests), les surnageants cellulaires sont récupérés et stockés à - 20°C jusqu'à la fin de l'expérience puis analysés selon les méthodes décrites ci-après.

4.1.5.1 Cytokines

Les cytokines TNF- α , IL-1 β , IL-6 et IL-10 sont mesurées dans les surnageants en utilisant les kits ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (R&D Systems).

4.1.5.2 Métalloprotéinases (MMPs) et leurs inhibiteurs (TIMPs)

Les MMPs jouent un rôle important dans la dégradation de la matrice extra-cellulaire. Leur activité protéolytique est l'un des mécanismes effecteurs du remodelage tissulaire

dans des conditions physiologiques et pathologiques. De plus, elles interviennent dans la modulation de l'inflammation. La perturbation de la balance entre ces enzymes et leurs inhibiteurs (TIMPs) est un facteur important qui peut conduire à un remodelage et endommagement tissulaire notés lors des maladies inflammatoires (Mautino et al., 1999).

Pour mesurer l'effet des nanoparticules sur l'induction des MMPs, la gélatinase A (MMP-2) et gélatinase B (MMP-9) sont mesurées dans les surnageants cellulaires, après le traitement des THP-1 avec différentes concentrations de nanoparticules : 0.1, 1, 10 et 20 µg/mL (en se basant sur la concentration totale d'ADN).

La sécrétion de leurs inhibiteurs (TIMP-2 et TIMP-1) est aussi mesurée dans les mêmes conditions. Des kits ELISA (R&D Systems) sont utilisés pour leur détection. Les temps d'incubation avec les cellules varient de 1 heure à 72 heures.

4.1.5.3 Zymographie

Les gélatinase A (MMP-2) et B (MMP-9) latentes et actives sont déterminées en utilisant des gels de SDS-polyacrylamide ayant copolymérisé en présence de 0.2% de gélatine. Ces enzymes se séparent des inhibiteurs de métalloprotéinases (TIMPs) grâce à la présence du SDS durant l'électrophorèse. Elles sont visualisées après utilisation de témoins MMP-2 et MMP-9 standards (Chemicon International).

La zymographie s'est effectuée sur les surnageants et sur les extraits cellulaires pour détecter la forme sécrétée et la forme intra-cellulaire.

4.2 Induction de l'apoptose et inhibition du TNF- α

4.2.1 Les polymères

Deux polymères sont utilisés pour cette étude, le chitosane (Ch) et le polyéthylèneimine (PEI) de poids moléculaires différents (150, 400 et 600 kDa pour le Ch et de 2, 25 et 750 kDa pour le PEI).

Les solutions de Ch sont préparées tel que décrit dans la section précédente (point 3.1.1).

Les stocks de solutions de PEI sont préparées en dissolvant 9 mg de la solution commerciale (50% P :V) dans 10 mL d'eau déionisée ultrapure, d'après la technique de Boussif et al. (1995).

Le pH des solutions est ajusté à 7.4 avec de l'acide chlorhydrique (HCl). Ces dernières sont filtrées en utilisant un filtre de 0.22 μ m pour les stériliser.

Les procédures subséquentes sont effectuées dans des conditions de stérilité absolue sous hotte biologique.

4.2.2 Plasmides et Oligodéoxynucleotides (ODN)

Le plasmide pORF-Bax-a est obtenu de Biosource (Montréal, Canada), et amplifié dans des bactéries *Escherichia coli* DH5- α compétentes.

Les ODN anti-TNF- α sont obtenus de Biosource (Montréal, Canada).

4.2.3 Synthèse des nanoparticules

Les nanoparticules à base de Ch sont synthétisées tel que décrit dans la section 3.1.1 en utilisant différentes concentrations du polymère (0.01, 0.02 et 0.05 %) aux différents poids moléculaires.

Les nanoparticules à base de PEI sont synthétisées selon la technique de Boussif et al. (1995) en utilisant différentes concentrations du polymère. (0.225, 0.45 et 0.9 mg/mL) à différents poids moléculaires.

L'ADN, les oligonucléotides et le PEI sont resuspendus dans du NaCl à 150 mM.

Les solutions sont préparées séparément dans un volume maximal de 150 µl, puis les ODN ou les plasmides sont mélangés par vortex.

4.2.4 Culture cellulaire

Les mêmes cellules et conditions de culture décrites dans la section 3.1.3 sont utilisées pour les études décrites ci-dessous.

4.2.5 Étude de cytotoxicité

Cette étude est une étape préliminaire avant l'étude de l'induction de l'apoptose; le but étant de sélectionner les conditions où la viabilité cellulaire est altérée par les nanoparticules mais non par le polymère seul. Ceci est important surtout pour le PEI qui est connu pour sa cytotoxicité à des concentrations élevées et à certains poids moléculaires.

Pour cette étude, les cellules sont cultivées dans des plaques de 96 puits et traitées avec différentes nanoparticules synthétisées avec les différentes concentrations du Ch et PEI. Par ailleurs, la concentration de l'ADN est maintenue constante (1 µg).

Le test MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide, Sigma) développé par Mosmann (1983) est utilisé pour évaluer la viabilité cellulaire. Cette dernière est basée sur la capacité de l'enzyme déshydrogénase, présente au niveau des

mitochondries, à cliver les anneaux tetrazolium du MTT. Suite à cette métabolisation, des cristaux bleus sont formés. Leur dissolution avec de l'isopropanol-HCl 0.1 N permet d'évaluer l'activité cellulaire qui est exprimée en densité optique, après lecture par un spectrophotomètre (Biorad M-550). La viabilité cellulaire est proportionnelle à la densité optique émise suite à la lecture à 570 nm.

4.2.6 Induction de l'apoptose

L'étude de cytotoxicité a permis d'éliminer le Ch à cause de son manque d'efficacité dans l'induction de la mortalité cellulaire, suite à sa complexation avec le plasmide Bax- α .

Le PEI de poids moléculaire 25 et 750 kDa a aussi été éliminé car il induit le même taux de toxicité par lui-même que lorsqu'il est complexé avec le plasmide.

L'étude de l'apoptose est alors effectuée en utilisant le PEI de bas poids moléculaire à la concentration de 0.9 mg/mL pour la complexation du plasmide pORF-Bax- α . Tout en maintenant la concentration du PEI, la concentration de L'ADN est variée (1 et 5 μ g) afin de déterminer les conditions optimales de l'induction de l'apoptose chez les THP-1.

Après traitement des cellules avec les nanoparticules et les témoins appropriés, la cytométrie en flux est utilisée pour évaluer l'apoptose.

Le kit Annexin V-phycoerythrin (PE) (BD Biosciences Pharmingen) est utilisé car il permet de détecter l'apoptose à un stade précoce.

4.2.7 Étude de l'inhibition du TNF- α

Lors de cette étude, les macrophages sont stimulés avec 50 nM de LPS, pendant 4 heures. Par la suite le milieu est éliminé et remplacé par du milieu frais contenant des nanoparticules de PEI-ODN où la concentration des oligonucléotides est variée (1, 5 et 10 μ M). Après 6 heures, la sécrétion du TNF- α est évaluée par ELISA.

CHAPITRE V

5. EFFETS DE L'INTERNALISATION DES NANOPARTICULES À BASE DE CHITOSANE SUR LES THP-1

Ce chapitre porte sur les résultats obtenus suite à l'incubation des nanoparticules à base de chitosane avec la lignée de macrophages THP-1.

Comme les macrophages sont les premières cellules qui interceptent les nanoparticules, après leur injection *in vivo*, nous avons voulu étudier les effets que leur internalisation est susceptible d'induire chez ces cellules, plus précisément, l'influence sur les médiateurs de l'inflammation et les métalloprotéinases qui, lorsque sécrétées à des doses élevées, sont responsables de la dégradation des tissus environnants.

Les résultats de ce travail ont fait l'objet d'une publication parue dans le journal « Biomaterials », numéro 26 : 961-970 de l'année 2005, et dont le titre original est : « **Metalloproteinase and cytokine production by THP-1 macrophages following exposure to Chitosan-DNA nanoparticles** ».

Les macrophages sont incubés avec différentes concentrations de nanoparticules obtenues par la complexation du polymère polycationique, le chitosane et de l'ADN plasmidique VR1412.

Nous avons donc étudié les paramètres suivants :

- L'internalisation des nanoparticules par les macrophages en fonction du temps ;
- L'induction de la sécrétion des cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6 et IL-10) par ELISA ;

- L'induction de la sécrétion des métalloprotéinases MMP-2 et MMP-9 ainsi que leurs inhibiteurs TIMP-2 et TIMP-1 par ELISA ;
- La présence des MMPs-1 et -2 dans les surnageants et dans les extraits cellulaires, suite à l'incubation des cellules avec différentes concentrations de nanoparticules.

**METALLOPROTEINASE AND CYTOKINE PRODUCTION BY THP-1
MACROPHAGES FOLLOWING EXPOSURE TO CHITOSAN-DNA
NANOPARTICLES.**

Fatiha Chellat*¹, Alexia Grandjean-Laquerriere², Richard Le Naour², Julio Fernandes⁴,
L'Hocine Yahia¹, Moncef Guenounou², Dominique Laurent-Maquin³

¹ Biomedical Engineering Institute, École Polytechnique de Montréal, Montréal, Québec,
Canada

² Laboratoire d'immunologie, UFR de Pharmacie, Reims, France

³ EA 2068 « Biomatériaux, Nanophysicochimie des interfaces-Interactions biologiques
avec les tissus hôtes », IFR 53, Faculté d'Odontologie, Reims, France

⁴ Centre de recherche du CHUM-Hôpital Notre-Dame, 1560 Sherbrooke Est, Montreal,
Quebec, Canada, H2L 4M1

Keywords : macrophages, Chitosan-DNA nanoparticles, Metalloproteinases, cytokines

5.1 Abstract

The use of nanoparticles for gene therapy is gaining more and more interest for medical applications. Chitosan is among the candidate polymers that have a potential application as a gene delivery system. Before using chitosan-DNA nanoparticles *in vivo*, one must study their interaction and cell's behavior. Since macrophages play an important role in inflammatory processes, this study was performed to investigate the effects of chitosan-DNA nanoparticles on human THP-1 cell line. Cytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10) and metalloproteinase (MMP-2 and MMP-9) release as well as their inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2) were assessed after time course incubation with different amount of nanoparticles. Their secretion was quantified by Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Gelatinolytic activity of MMP-2 and MMP-9 was determined by zymography in cell supernatants and lysates.

Cytokine secretion was not detected even in the presence of high amount of nanoparticles. On the contrary, the secretion of MMP-9 in cell supernatants increased significantly after 24 and 48 hours in comparison with non-treated cells. MMP-2 secretion was augmented only after 48 hours for the highest concentrations of nanoparticles (10 and 20 $\mu\text{g/mL}$ DNA content). However, zymography studies showed that the secreted MMPs were in the proactive forms, while the active form of MMP-9, but not MMP-2, was detected in cell lysates when 10 and 20 $\mu\text{g/mL}$ DNA containing nanoparticles were used.

In conclusion, exposure of THP-1 macrophages to Ch-DNA nanoparticles did not induce release of proinflammatory cytokines. The presence of active MMP-9 within the macrophages could possibly be related to nanoparticle phagocytosis and degradation rather than to inflammatory reactions.

5.2 Introduction

Several vector systems have been developed for gene transfer studies with potential clinical applications. However, a number of drawbacks have been reported that hampers the application of gene therapy in this setting. Viruses are among the most precise and stable gene vectors which have been used as the most effective way to transfer genes into eukaryotic cells [1]. However, endogenous virus recombinations, oncogenic effects, and immunological reactions lead to serious limitations regarding their use as vectors for human gene therapy [2-4]. These safety considerations have resulted in an increased interest in non-viral vectors as new gene vehicles. Among them, cationic polymers are used to form complexes with DNA after electrostatic interactions [5]. This process leads to DNA condensation and formation of polyplexes which promote cellular internalization of plasmids and provides a protection against enzymatic degradation [6]. It also allows its sustained release [7, 8], effective delivery to the target site and good transfection and expression rates [9]. Chitosan (Ch) figures among the candidate polymers that have a potential application as a gene delivery system. It is known for its biodegradability and biocompatibility [10] and has been shown to form colloidal particles and entrap macromolecules through different mechanisms. Studies on Ch capabilities to bind, condense and protect DNA from nuclease degradation have already been reviewed [11]. We have previously shown the absence of cytotoxicity of Ch-DNA nanoparticles on different cells types (human mesenchymal stem cells, embryonic kidney cell-line and MG-63 osteoblast-like cell-line) [12]. Ch based nanoparticles were well characterized and their transfection efficiency seems to be cell-dependent [12-17]. Moreover, Ch containing multiple plasmids was investigated for *in vivo* transfection showing a sustained and high protein expression in mice muscle tissue [18].

As a particulate drug carrier, Ch-DNA nanoparticles are susceptible to be taken up by macrophages of the mononuclear phagocytic system which recognize them as a foreign body material. This occurs as a result of opsonization process which leads to their covering by plasma proteins and glycoproteins [19]. The facility of macrophages to

internalize nanoparticles could play an important role in their spreading and distribution [20]. Consequently, several attempts aiming at the development of therapeutic strategies using viral and non-viral systems for macrophage-associated pathogenesis have been reported. [21-23]. For example, macrophage targeting may play an important role in mediating cytotoxicity against tumors. After phagocytosis of doxorubicin-loaded nanoparticles, macrophages were able to release active drugs resulting in tumor cell death, which was increased by cytotoxic factors released after macrophage activation [24]. In an other study, a single intraperitoneal injection of plasmid DNA containing cytokine gene IL-10 complexed to cationic liposomes resulted in a human IL-10 expression and was sufficient to give significant and prolonged improvement of arthritis symptoms for 30 days [25].

Despite these promising results, very little has been reported on the activity of macrophages after the uptake of Ch-DNA nanoparticles. These cells play an important role in directing the host foreign body reactions and could impact the biocompatibility, mainly via the production of various proinflammatory mediators. The present study was designed to investigate the effects of Ch-DNA nanoparticles after their internalization by macrophages. The THP-1 human macrophage cell-line was used for incubation with Ch-DNA nanoparticles. Time course internalization and uptake of labeled nanoparticles were visualized by flow cytometry and fluorescence microscopy. Release of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 β , and IL-6 as well as the anti-inflammatory IL-10 was evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the cell culture supernatants. Same method was used for the assessment of metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) and their respective inhibitors (TIMP-2 and TIMP-1) after different incubation periods. Zymography was used for measurement of MMPs gelatinolytic activity in cell supernatants and cell lysates [26].

5.3 Materials and Methods

5.3.1 Preparation of Ch-DNA nanoparticles

The chitosan used for the preparation of the nanoparticles has a molecular weight of 400 kDa (Fluka Biokemica, Buchs, Switzerland) and a degree of deacetylation of 82%. The plasmid DNA VR1412 encoding the β -galactosidase reporter gene with a CMV promoter was obtained from VICAL Inc. (San Diego, CA, USA). The nanoparticles were prepared based on a method reported by Mao et al [27]. A chitosan stock solution (0.1%) was prepared by dissolving the polymer in 5 mM sodium acetate buffer, pH 5.5. The solution was then filtered under sterile conditions. Plasmid DNA solution (100 μ g/mL) was prepared in 4.3 mM of sterile filtered sodium sulfate (Na_2SO_4) solution. 100 μ l of each DNA and chitosan solutions were mixed together after preheating at 55°C, and then vortexed for 60 seconds.

5.3.2 FITC nanoparticles labeling

Nanoparticles were made fluorescent by labeling the chitosan in solution before the complexation process with DNA. Briefly, 10 mg of fluorescein-5-isothiocyanate (FITC) (Molecular probes Inc., USA) were dissolved in 1 mL of dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma, St-Louis, MO, USA). Then, 100 μ l of the chitosan solution (0.1% stock solution) was mixed with the FITC solution and vortexed for 1 hour. FITC labeled chitosan was then precipitated in 5 mL of 1×10^{-6} N sodium hydroxyde (NaOH) solution, pH 8. Chitosan precipitate was harvested after centrifugation at 2500 rpm for 10 minutes and washed with sterilized deionized water. The pellet was then resuspended in 0.22 μ m filtered acetate buffer (0.34 mL acetic acid, 1.915 g sodium acetate in 100 mL deionized water). The resulting chitosan solution was used to prepare labeled Ch-DNA nanoparticles as described above.

5.3.3 Cell culture

THP-1 human macrophages (American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD), which are known for their phagocytic activity, were cultured in RPMI 1664 supplemented with 10% heat inactivated (1 h at 56°C) FBS (Gibco, BRL), L-Glutamin 2 mM and penicillin (100 units/mL)/streptomycin (100 ng/mL) and $5 \cdot 10^{-5}$ M of 2-mercaptoethanol (Sigma, St Louis, MO, USA).

5.3.4 Internalization studies

5.3.4.1 Flow cytometry

The internalization of labeled nanoparticles was determined by flow cytometry. Following macrophage incubation with the FITC labeled Ch-DNA nanoparticles for 1, 6 and 24 hours, the cells were harvested and centrifuged. The pellet was then washed three times with PBS and resuspended in 500 μ l of 1% paraformaldehyde in the same buffer. Analyses of the internalized nanoparticles were then performed using a Beckman Coulter flow cytometer.

5.3.4.2 Fluorescence microscopy

Phagocytic uptake of FITC labeled Ch-DNA nanoparticles was evaluated by fluorescence microscopy (BioRad MicroRadiance confocal microscope). After 1, 6, and 24 hours of culture, the cells were harvested, centrifuged and washed 3 times with PBS. They were then fixed in 1% formaldehyde/PBS buffer and seeded on glass slides for observation.

5.3.5 ELISA for Cytokines, MMPs and TIMPs

The cells were seeded in 24 wells culture-plate at the density of 5×10^5 cells/well/mL and incubated with different concentrations of Ch-DNA nanoparticles. Based on DNA content, we used 0.1, 1, 10, 20 μ g per well. Lipopolysaccharide (LPS, Sigma) at the concentration of 1 μ g/mL was used as a positive control whereas negative control consisted of medium alone. After 1, 6 and 24 hours, the supernatants were harvested centrifuged, aliquoted and stored at -80°C until different cytokine determination.

The concentrations of human cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10), MMPs (MMP-2, MMP-9) and TIMPs (TIMP-2, TIMP-1) in THP-1 culture supernatants were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Quantikine ELISA kits, R&D systems). Their amounts were calculated by reference to standard curves constructed with fixed concentrations of the human recombinant cytokines, MMPs and TIMPs. The optical density (OD) was measured using a microplate scanning spectrophotometer (Bio-Tek Instruments Inc., VT, USA) at 450 nm. The measurements were performed in triplicata and expressed in ng/mL or pg/mL. The minimum detectable dose of each cytokine are as follows: TNF- α , 4.4 pg/mL; IL-1 β , 1pg/mL; IL-6, 0.7 pg/mL; IL-10, 3.9 pg/mL; MMP-2, 0.5 ng/mL; MMP-9, 0.1 ng/mL; TIMP-1, 9.6 pg/mL; and TIMP-2, 3 ng/mL.

5.3.6 MMP-2 and MMP-9 gelatinolytic activity

Zymogram analyses were performed using 10% polyacrylamide–SDS gels containing type A gelatin (0.2% [vol/vol]; Sigma) as the proteinase substrate for latent (pro) and active MMP-2 (gelatinase A) and MMP-9 (gelatinase B) detection. Their presence was analyzed in both cell medium supernatants and cell lysates after electrophoresis under non-reducing conditions. Both proenzyme and active gelatinase were detected as clear bands against the blue background of the stained gelatin. Positive controls for gelatinase A and B (Chemicon International) were used to identify the two enzymes and their activated forms.

After sample electrophoresis for 2 h at 95 V, MMPs were renatured by removal of SDS by immersing the gel for 1 h in Triton X-100 (2% [vol/vol]). To allow proteolysis of the gelatin substrate, the gels were incubated in 50 mM Tris-HCl, 0.2 M NaCl, 5 mM CaCl₂, 0.02% NaN₃, Triton X-100, pH 7.6 activating buffer for overnight at 37°C [28]. Proteolytic bands were visualized by gel staining in 1% Coomassie Brilliant blue (Biorad, R-250) before destaining with methanol/acetic acid (30/10%) solution.

5.3.6.1 MMP-2 and MMP-9 detection in cell supernatants

After incubation of THP-1 with Ch-DNA nanoparticles, medium samples were collected after 1, 6, 24, 48 and 72 hours and used for measurements of MMPs activity. 20 µl of each sample was electrophoresed. The gelatinolytic activities of MMP-9 and MMP-2 in cell supernatants were determined by quantitation of gelatin lysis zones. Gels were scanned and densitometry of substrate lysis zones at 92 (MMP-9) and 72 (MMP-2) kDa was measured by using the Biorad Software.

5.3.6.2 MMP-2 and MMP-9 activity in cell lysates

After incubation of THP-1 with Ch-DNA nanoparticles for the indicated periods of time, the cells were centrifuged and washed 3 times with PBS (Gibco). The cells were lysed with ice-cold lysis buffer containing Tris-HCl, pH 8.1 and 0.4% Triton and the supernatants collected after centrifugation at 15 000 x g for 15 minutes at 4°C. Protein content of each sample was then measured using Bradford method (Biorad). To ensure total equivalent protein loading, the samples were diluted in sample buffer (0.4 M Tris-HCl pH 6.8, 5% SDS, 20% glycerol, 1% bromphenol blue) to a loading volume of 20 µl.

5.3.7 Statistical analyses

The experiments were repeated three times with different batches of nanoparticles and the analyses performed in triplicate. Data are presented as mean \pm standard deviation. Statistical analyses were performed using the *ANOVA* (*a one-way analysis of variance*), followed by Bonferroni *t*-test for comparison with the control group. Statistical significance was determined at a $P < 0.05$.

5.4 Results

5.4.1 Nanoparticle uptake by macrophages

Figure 5.1a shows a representative flow cytometric assessment of nanoparticles uptake by macrophages. We can see that the internalization of FITC labeled Ch-DNA nanoparticles by THP-1 macrophages occurs within the first hour and increased at 24 hours (figure 5.1b).

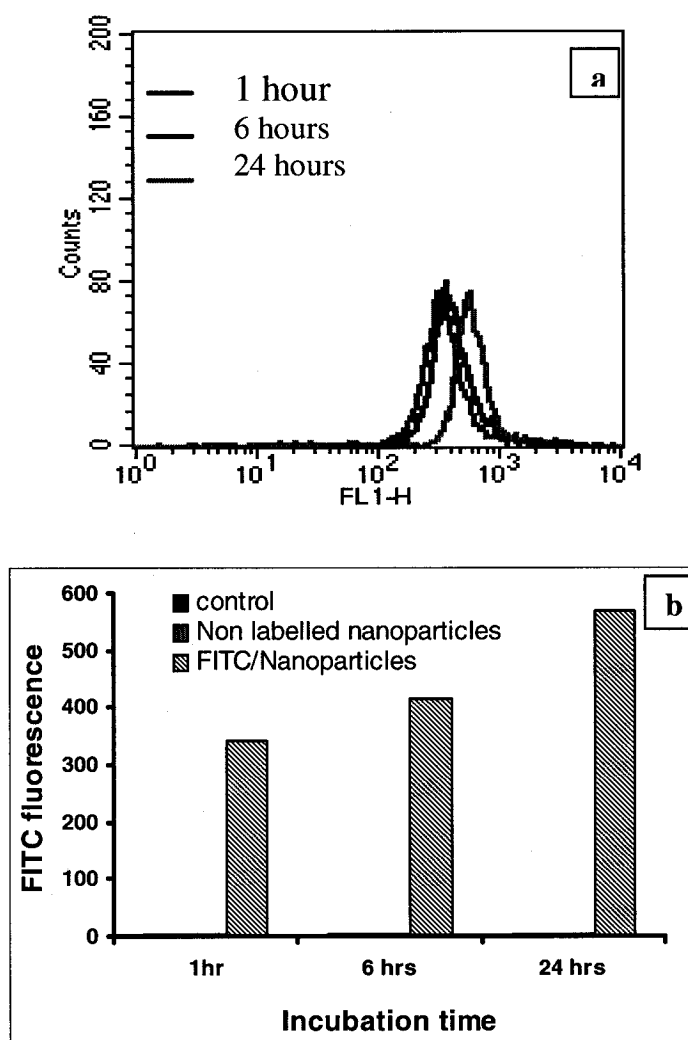


Figure 5.1 The kinetics of FITC labeled Ch-DNA nanoparticles uptake by THP-1 was evaluated by flow cytometry after 1, 6 and 24 h (a). The FITC fluorescence was detected for the cells which were incubated with labeled nanoparticles. Cells alone and those which were incubated with non-labeled nanoparticles were used as controls. In these cases, no signal was detected. A histogram representation of the fluorescence as a function of incubation time is shown in the bottom diagram (b).

These results were confirmed by fluorescence microscopy where FITC labeled Ch-DNA nanoparticles were seen in the THP-1 macrophages within 1 hour of incubation (fig. 5.2a-d).

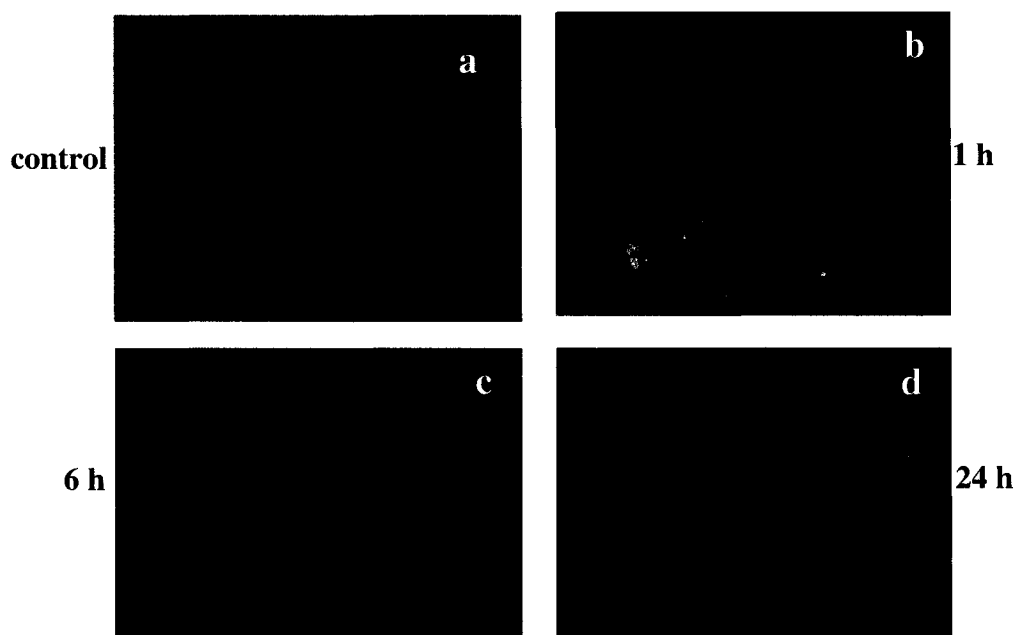


Figure 5.2 After Ch-DNA nanoparticle FITC labelling, their uptake by THP-1 macrophages is showed by fluorescence microscopy following different incubation periods (a: control; b: after 1 hour; c: after 6 hours; d: after 24 hours).

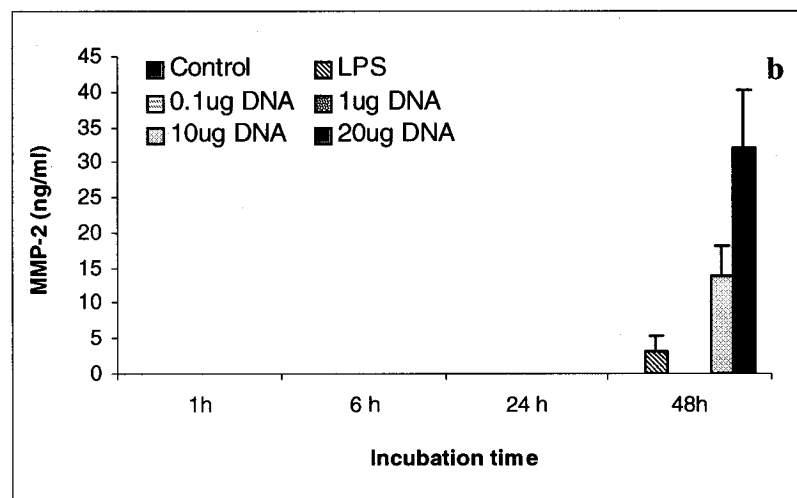
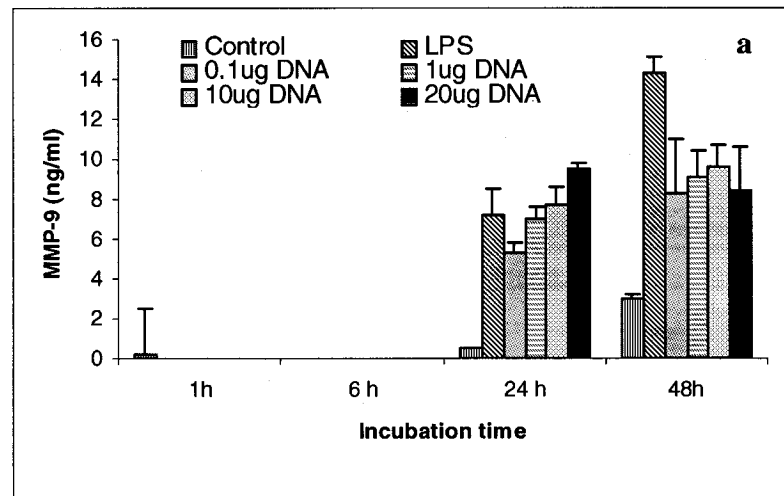
5.4.2 ELISA for Cytokine, MMP and TIMP release

Exposure of THP-1 to Ch-DNA nanoparticles did not stimulate cytokine production whatever the concentration or the time of incubation used. As shown in table 4.1, no production of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10 was detected in the supernatants by ELISA. The LPS positive control induced release of the cytokines with a maximum level of TNF- α being reached after 6 hours. Maximal secretion of the other cytokines (IL-1 β , IL-6 and IL-10) was noticed after 24 hours of exposure to Ch-DNA nanoparticles.

MMP-9 release from THP-1 was significantly raised after 24 and 48 hours incubation irrespective of the Ch-DNA nanoparticle concentrations (fig. 5.3a). MMP-2 was detected after 48 hours only in the presence of the 2 highest nanoparticle concentrations (fig. 5.3b). TIMP-1 was constitutively released in all samples including non-treated cells (fig. 5.3c) but was significantly increased by the concentrations of Ch-DNA nanoparticles after 24 and 48 hours incubation. TIMP-2 was not detected (data not shown).

Tableau 5.1: Release of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10 was assessed after cell incubation with different concentrations of Ch-DNA nanoparticles. Only cell treatment with LPS (positive control) allowed cytokine detection in cell supernatants (*: $p < 0.05$), (-): represents the values which are under the detection limit.

Cytokine (pg/mL)		Control	LPS	DNA content (μ g)			
				0.1	1	10	20
TNF- α	1 h	-	-	-	-	-	-
	6 h	-	1226 \pm 76.2*	-	-	-	-
	24 h	-	568.5 \pm 28.8*	-	-	-	-
IL1- β	1 h	-	-	-	-	-	-
	6 h	-	-	-	-	-	-
	24 h	-	10.1 \pm 7.9*	-	-	-	-
IL-6	1 h	-	-	-	-	-	-
	6 h	-	49.5 \pm 2.5*	-	-	-	-
	24 h	-	169.7 \pm 21.4*	-	-	-	-
IL-10	1 h	-	-	-	-	-	-
	6 h	-	27.9 \pm 9.7*	-	-	-	-
	24 h	-	111.8 \pm 1.9*	-	-	-	-



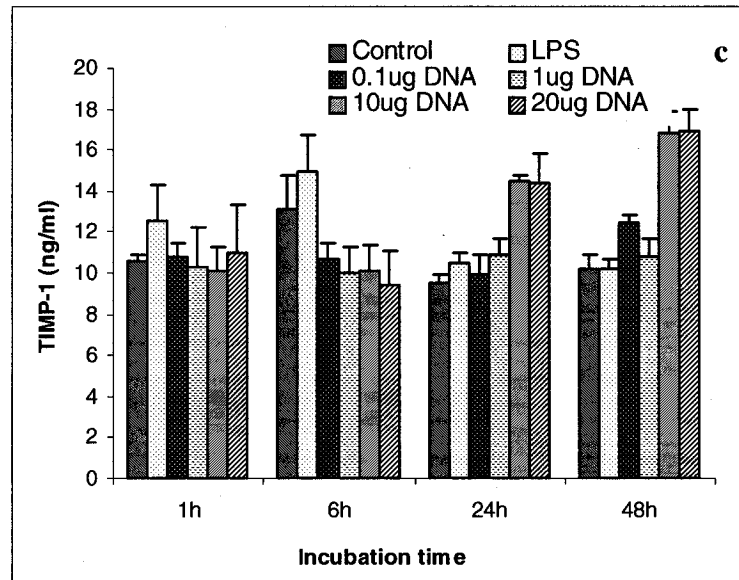


Figure 5.3 MMP-9 (a), MMP-2 (b) and TIMP-1 (c) release were evaluated by ELISA in THP-1 cell supernatants after incubation with different concentrations of Ch-DNA nanoparticles; (*: $p < 0.05$).

5.4.3 Zymography studies

5.4.3.1 MMP-9 and MMP-2 in cell supernatants

Figure 5.4 shows the time course of MMP-9 and MMP-2 gelatinolytic activity following treatment of THP-1 with different concentrations of Ch-DNA nanoparticles and their control. The zymogram demonstrates that the activity of MMP-9 in cell supernatants is increased after 24 hours of incubation with the nanoparticles as well as with LPS, used as a positive control (fig. 5.4a). Figure 5.4b shows the MMP-9 densitometry quantification analysis of substrate lysis zones and indicates that the increase in the secretion after 24 hours was not significantly affected by the concentrations of the nanoparticles. MMP-2 secretion (fig. 5.4c) was similar to that of the control and not affected by the incubation period or the concentrations used.

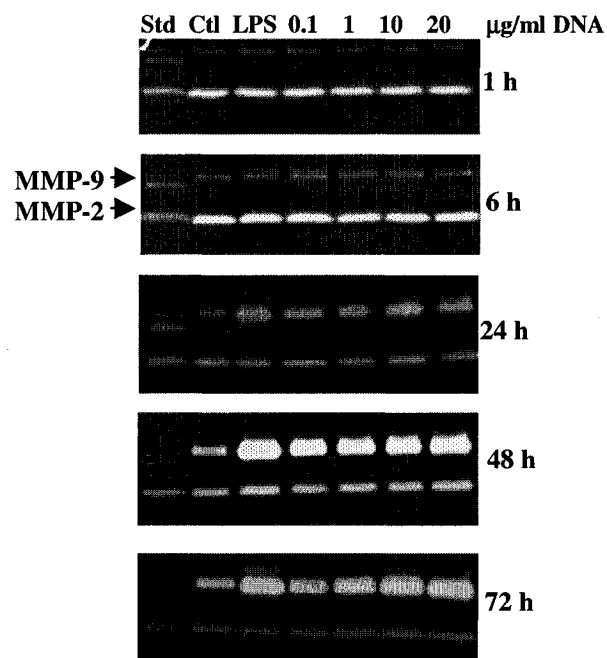


Figure 5.4a Time-course detection of MMP-9 and MMP-2 gelatinolytic activity in cell supernatants was determined by zymography (a). (b). MMP-2 secretion was similar to that of the control and not affected by the incubation periods and nanoparticle concentrations (c). (O.D.: optical density; *: $p < 0.05$).

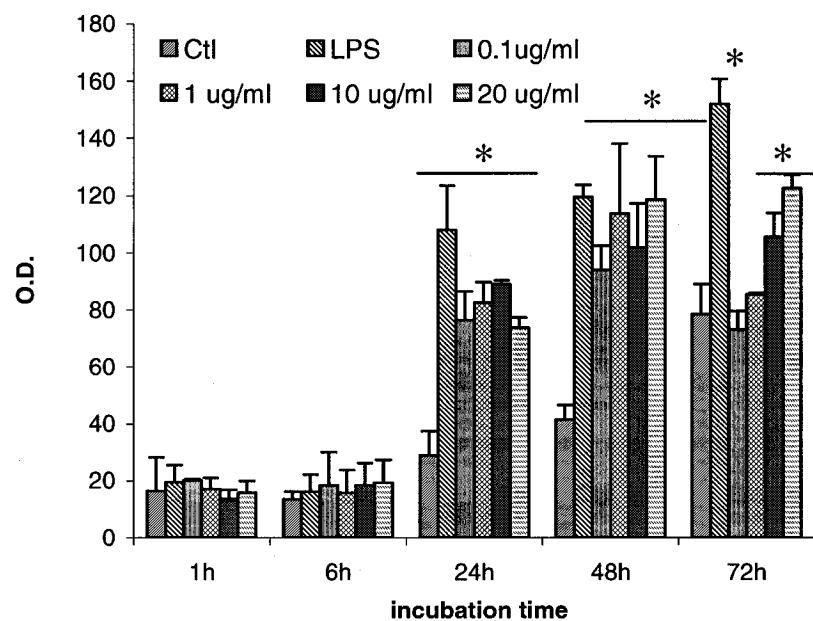


Figure 5.4b Densitometry quantification of lysis zones indicated a significant increase of MMP-9 activity in comparison with the control after 24 hours (O.D.: optical density; *: $p < 0.05$).

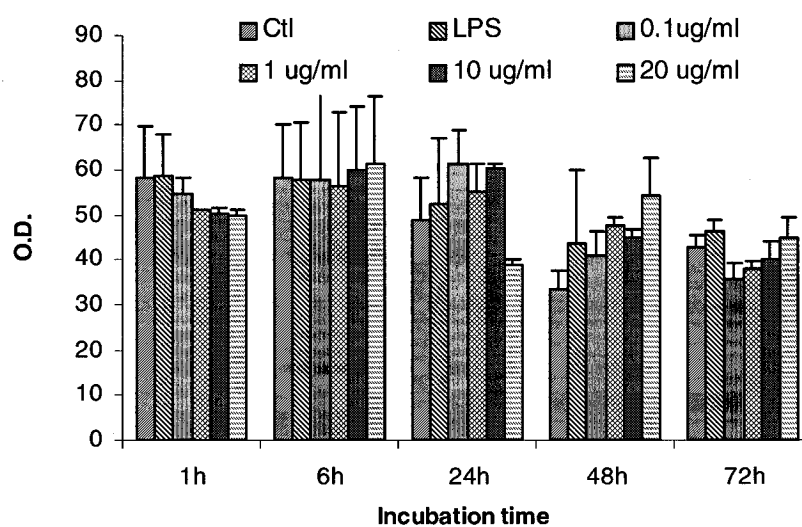


Figure 5.4c MMP-2 secretion was similar to that of the control and not affected by the incubation periods and nanoparticle concentrations (c). (O.D.: optical density).

5.4.3.2 MMP-9 and MMP-2 activity in cell lysates

As shown in figure 5.5, MMP-9 activity was increased after 48 hours of incubation with high concentrations of nanoparticles (10 and 20 μg DNA content) whereas it occurred earlier after treatment with LPS (24 hours). On the other hand MMP-2 was not detected in cell lysates. A band localized at 92 kDa, which represents the active form of MMP-9, was absent in cell supernatants.

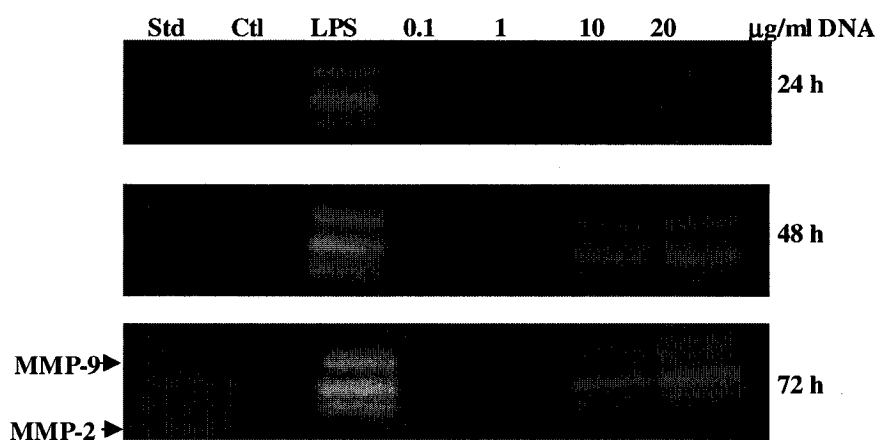


Figure 5.5 Time-course detection of MMP-9 and MMP-2 gelatinolytic activity in THP-1 cell lysates shows an increase of MMP-9 activity after 48 hours of incubation with high concentrations of nanoparticles (10 and 20 μg DNA content). MMP-2 was not detected while the active form of MMP-9 was present.

5.5 Discussion

As a particulate foreign body, nanoparticles could induce a host response such as inflammatory cytokines and MMPs release which play a major role in tissue destruction and remodeling. The response of macrophages is of great importance because they are the first cells which intercept the carriers after *in vivo* administration. Subsequently to nanoparticle ingestion, they may release an arsenal of active substances with potential

deleterious effects on surrounding tissues. Results of the present study highlight the fact that, internalization of Ch-DNA nanoparticles by macrophages does not appear to modify their inherent inflammatory activity. Indeed, the release of the pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β and IL-6 was not induced following the ingestion of nanoparticles as well as of the anti-inflammatory cytokine IL-10 which has been suggested to be involved in down-regulation of MMP-2 and MMP-9 release [29]. Using solid lipid nanoparticles, Scholer et al. pointed out that their cytotoxicity was related to their concentrations [30]. However, the concentrations of Ch-DNA nanoparticles used in our study did not result in cell death as assessed by total protein content and blue trypan exclusion dye performed on the THP-1 macrophage cell-line, and thus independently of the incubation time (data not shown).

The release of MMPs and TIMPs as well as cytokines, which regulate their production, can mediate tissue destruction but also repair. An imbalance between enzymes and inhibitors is an important factor which may lead to tissue damage and remodeling seen in inflammatory diseases [31]. It has been reported that activated macrophages up-regulate the activity of MMPs with gelatinase, caseinase, elastinase and collagenase activity [32-34]. This proteolytic activity confers them the ability to degrade the extracellular matrix in many pathological processes. Studies performed on MMP production by macrophages showed that they are of major importance in the pathology of cancer, asthma, and rheumatoid arthritis [35]. Also, they are involved in the regulation of biologic processes such as do MMP-2 in osteogenesis [36]. Considering that, we assessed the effect of Ch-DNA nanoparticles on the induction of MMP-2 and MMP-9 in THP-1.

Our study showed that Ch-DNA nanoparticles internalization by macrophages did not stimulate MMP-2 release whereas MMP-9 was significantly increased in cell supernatants. Cell lysate samples showed an increased MMP-9 activity but not MMP-2. Interestingly, the proactive form of MMP-9, which was undetectable in cell supernatants, was present in cell lysates. We could suspect that the presence of active MMP-9 in cell lysates may be related to nanoparticle phagocytosis and degradation rather than an

inflammatory effect since we failed to demonstrate the inflammatory effect of Ch-DNA nanoparticles via cytokine assessment. However, this remains to be evidenced and deserves further studies as well as the mechanisms by which MMP-9 is modulated after incubation of macrophages with the nanoparticles.

Release of TIMP-1 and TIMP-2 was also investigated because, in addition to their metalloproteinase inhibiting activities, they play an important role in cell growth-promoting activities [37, 38]. ELISA did not reveal the presence of TIMP-2 in cell supernatants (data not shown) and the level of TIMP-1 was increased after treatment with the two highest concentrations of Ch-DNA nanoparticles after 24 and 48 hours. Further studies at the transcriptional level could provide us with information regarding the regulation of these molecules and their mRNA half-life.

Understanding the interaction of DNA/non-viral carriers and their effects on macrophages are necessary to optimize therapeutic targeting to these cells for the development of effective macrophage-mediated therapy systems. From safety point of view, the absence of inflammatory effect, Ch-DNA nanoparticles seem to be a promising drug delivery system. On the other hand, it remains to determine the correlation between intracellular presence of active MMP-9, TIMP-1 secretion and Ch-DNA nanoparticle degradation and phagocytosis.

5.6 Conclusion

The nature of interactions between macrophages and nanoparticles is of primordial importance for the design of more effective therapeutic strategies for macrophage associated pathogenesis or the establishment of new approaches for pharmacological action avoiding macrophages. The targeting of these cells represents a very promising issue for macrophage-mediated therapeutics. Their natural tendency to migrate into diseased tissue sites, in response to the release of cytokines/chemokines, makes them useful to deliver targeted gene therapy. Several attempts in targeted macrophage gene therapy are very encouraging and may constitute promising approaches against many

diseases. The passive targeting of gene carriers to cells of the mononuclear phagocytic system provides the advantage of specific targeting of drugs and immunomodulators to macrophages.

5.7 Acknowledgments

The authors would like to thank Drs. Y. Merhi from experimental pathology department of Montreal Heart Institute and A. Moreau from Sainte-Justine Children's hospital for manuscript revision and helpful discussions. We are also grateful to Mrs. S. Bouthors, C. Guillaume and N. Lalun from UFR d'Odontologie of University of Reims for technical assistance. This work was supported in part by grants from Fonds de recherche France-Quebec and NanoQuebec. F. C. received a fellowship from MENTOR, a training program in mobility and posture disorders of Canadian Institutes of Health Research (CIHR).

5.8. References

1. Wilson JM. Adenovirus as gene-delivery vehicles. *N Engl J Med* 1996;334:1185-1187.
2. Kabanov AV, Kabanov VA. DNA complexes with polycations for the delivery of genetic material into cells. *Bioconjug Chem* 1995;6:7-20.
3. Boris-Lawrie K, Temin HM. The retroviral vector. Replication cycle and safety considerations for retrovirus-mediated gene therapy. *Ann N Y Acad Sci* 1994;716:59-70.
4. Temin HM. Safety considerations in somatic gene therapy of human disease with retrovirus vectors. *Hum Gene Ther* 1990;1:111-123.

5. Tomlinson E, Rolland AP. Controllable gene therapy-Pharmaceutics of non-viral gene delivery systems. *J Control Release* 1996;39:357-372.
6. Bloomfield VA. DNA condensation. *Curr Opin Struct Biol* 1996;6:334-341.
7. Cohen H, Levy RJ, Gao J, Fishbein I, Kousaev V, Sosnowski S, Slomkowski S, Golomb G. Sustained delivery and expression of DNA encapsulated in polymeric nanoparticles. *Gene Ther* 2000;7:1896-905.
8. Kneuer C, Sameti M, Haltner EG, Schiestel T, Schirra H, Schmidt H, Lehr CM. Silica nanoparticles modified with aminosilanes as carriers for plasmid DNA. *Int J Pharm* 2000;196:257-261.
9. Truong-Le VL, August JT, Leong KW. Controlled gene delivery by DNA-gelatin nanospheres. *Hum Gene Ther* 1998;9:1709-1717.
10. Chandy T, Sharma CP. Chitosan--as a biomaterial. *Biomater Artif Cells Artif Organs* 1990;18:1-24.
11. Borchard G. Chitosans for gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;52:145-150.
12. Corsi K, Chellat F, Yahia L, Fernandes JC. Mesenchymal stem cells, MG63 and HEK293 transfection using chitosan-DNA nanoparticles. *Biomaterials* 2003;24:1255-1264.
13. Mao HQ, Roy K, Truong-Le VL, Janes KA, Lin KY, Wang Y, August JT, Leong KW. Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. *J Control Release* 2001;70:399-421.
14. Koping-Hoggard M, Mel'nikova YS, Varum KM, Lindman B, Artursson P. Relationship between the physical shape and the efficiency of oligomeric chitosan as a gene delivery system in vitro and in vivo. *J Gene Med* 2003;5:130-141.
15. Mumper RJ, Wang JJ, Claspell JM, Rolland AP. Novel polymeric condensing carriers for gene delivery. *Proc Int Symp Control Rel Bioact Mater* 1995;22:178-179.
16. Erbacher P, Zou S, Bettinger T, Steffan AM, Remy JS. Chitosan-based vector/DNA complexes for gene delivery: biophysical characteristics and transfection ability. *Pharm Res* 1998;15:1332-1339.

17. MacLaughlin FC, Mumper RJ, Wang J, Tagliaferri JM, Gill I, Hinchcliffe M, Rolland AP. Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery. *J Control Release* 1998;56:259-272.
18. Ozbas-Turan S, Aral C, Kabasakal L, Keyer-Uysal M, Akbuga J. Co-encapsulation of two plasmids in chitosan microspheres as a non-viral gene delivery vehicle. *J Pharm Pharm Sci* 2003;6:27-32.
19. Davis SS. Biomedical applications of nanotechnology--implications for drug targeting and gene therapy. *Trends Biotechnol* 1997;15:217-225.
20. Merodio M, Irache JM, Eclancher F, Mirshahi M, Villarroya H. Distribution of albumin nanoparticles in animals induced with the experimental allergic encephalomyelitis. *J Drug Target* 2000;8:289-303.
21. Merodio M, Irache JM, Eclancher F, Mirshahi M, Villarroya H. Distribution of albumin nanoparticles in animals induced with the experimental allergic encephalomyelitis. *J Drug Target* 2000;8:289-303.
22. Bender AR, von Briesen H, Kreuter J, Duncan IB, Rubsamen-Waigmann H. Efficiency of nanoparticles as a carrier system for antiviral agents in human immunodeficiency virus-infected human monocytes/macrophages in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:1467-1471.
23. Lobenberg R, Kreuter J. Macrophage targeting of azidothymidine: a promising strategy for AIDS therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996;12:1709-15.
24. Soma CE, Dubernet C, Barratt G, Benita S, Couvreur P. Investigation of the role of macrophages on the cytotoxicity of doxorubicin and doxorubicin-loaded nanoparticles on M5076 cells in vitro. *J Control Release* 2000;68:283-9.
25. Fellowes R, Etheridge CJ, Coade S, Cooper RG, Stewart L, Miller AD, Woo P. Amelioration of established collagen induced arthritis by systemic IL-10 gene delivery. *Gene Ther* 2000;7:967-977.
26. Arumugam S, Jang YC, Chen-Jensen C, Gibran NS, Isik FF. Temporal activity of plasminogen activators and matrix metalloproteinases during cutaneous wound repair. *Surgery* 1999;125:587-593.

27. Mao HQ, Roy K, Troung-Le VL, Janes KA, Lin KY, Wang Y, August JT, Leong KW. Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. *J. Control. Release* 2001;70:399-421.
28. Swallow CJ, Murray MP, Guillem JG. Metastatic colorectal cancer cells induce matrix metalloproteinase release by human monocytes. *Clin Exp Metastasis* 1996;14:3-11.
29. John M, Oltmanns U, Fietze I, Witt C, Jung K. Increased production of matrix metalloproteinase-2 in alveolar macrophages and regulation by interleukin-10 in patients with acute pulmonary sarcoidosis. *Exp Lung Res* 2002;28:55-68.
30. Schöler N, Hahn H, Muller RH, Liesenfeld O. Effect of lipid matrix and size of solid lipid nanoparticles (SLN) on the viability and cytokine production of macrophages. *Int J Pharm* 2002;231:167-176.
31. Mautino G, Henriquet C, Gougat C, Le Cam A, Dayer J-M, Bousquet J, Capony F. Increased Expression of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 and Loss of Correlation with Matrix Metalloproteinase-9 by Macrophages in Asthma. *Lab Invest* 1999;79:39-47.
32. Gibbs DF, Warner RL, Weiss SJ, Johnson KJ, Varani J. Characterization of matrix metalloproteinases produced by rat alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20:1136-1144.
33. Song E, Ouyang N, Horbelt M, Antus B, Wang M, Exton MS. Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts. *Cell Immunol* 2000;204:19-28.
34. Quinn CO, Scott DK, Brinckerhoff CE, Matrisian LM, Jeffrey JJ, Partridge NC. Rat collagenase. Cloning, amino acid sequence comparison, and parathyroid hormone regulation in osteoblastic cells. *J Biol Chem* 1990;265:22342-22347.
35. Robinson SC, Scott KA, Balkwill FR. Chemokine stimulation of monocyte matrix metalloproteinase-9 requires endogenous TNF- α . *Eur J Immunol* 2002;32:404-412.

36. Martignetti JA, Aqeel AA, Sewairi WA, Boumah CE, Kambouris M, Mayouf SA, Sheth KV, Eid WA, Dowling O, Harris J, Glucksman MJ, Bahabri S, Meyer BF, Desnick RJ. Mutation of the matrix metalloproteinase 2 gene (MMP2) causes a multicentric osteolysis and arthritis syndrome. *Nat Genet* 2001;28:261-265.
37. Hayakawa T, Yamashita K, Tanzawa K, Uchijima E, Iwata K. Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells A possible new growth factor in serum. *FEBS letters* 1992; 298:29-32.
38. Hayakawa T, Yamashita K, Ohuchi E, Shinagawa A. Cell growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *J Cell Sci* 1994;107:2373-2379.

CHAPITRE VI

6. UTILISATION DES NANOPARTICULES POLYMÉRIQUES POUR INDUCTION DE L'APOPTOSE ET INHIBITION DU TNF- α .

Ce chapitre constitue le troisième article soumis au journal « Biomaterials » sous le titre original de « **Polyplex nanoparticles for TNF- α inhibition and apoptosis induction in macrophages** ».

Dans ce chapitre, nous présentons les résultats obtenus suite au traitement des macrophages THP-1 par des nanoparticules produites par la complexation de plasmide contenant le gène Bax- α et des oligonucléotides anti-TNF- α avec deux polymères polycationiques, le chitosane (Ch) et le polyéthylèneimine (PEI).

Le but de ce travail a consisté à étudier le potentiel des deux polymères à véhiculer les acides nucléiques au niveau des cellules, à induire l'apoptose par le plasmide Bax- α et à inhiber le TNF- α chez les macrophages. Ceci est dicté par le fait que les macrophages sont impliqués dans le processus inflammatoire de plusieurs maladies telles que l'arthrite rhumatoïde et l'athérosclérose.

Nous présentons ici un résumé en français qui est suivi de l'article tel que soumis.

Les nanoparticules utilisées sont formées en utilisant le Ch et le PEI possédant des poids moléculaires variables étant donné que ce paramètre joue un rôle important dans l'efficacité et la biocompatibilité des polymères. Chaque polymère a été utilisé pour la complexation du plasmide pORF-Bax- α dont le gène est connu pour exercer un effet pro-apoptotique sur les cellules, dans le but d'induire l'apoptose chez les THP-1.

Les résultats obtenus suite à l'étude de l'effet des nanoparticules sur l'induction de la mortalité cellulaire ont permis de sélectionner les conditions optimales pour la suite du travail.

Nous avons montré que le PEI de bas poids moléculaire (25 kDa) répond aux exigences de biocompatibilité et d'efficacité contrairement au PEI de poids moléculaires 750 et 1 000 kDa. Quand au Ch, il est biocompatible mais moins efficace que le PEI. Nous avons alors maintenu l'utilisation du PEI de 25 kDa pour la suite de nos travaux.

L'utilisation de la cytométrie en flux a permis de déterminer le potentiel des nanoparticules à induire l'apoptose, après marquage des cellules par le kit d'annexine-V phycoerythrine (PE).

Les nanoparticules chargées avec les oligonucléotides anti-TNF- α ont été utilisées pour inhiber la sécrétion de la cytokine suite au traitement des cellules avec le LPS pendant 4 heures. La technique ELISA a permis de montrer une diminution de la sécrétion du TNF- α de 15%, suite à la complexation avec le PEI.

**POLYPLEX NANOPARTICLES FOR TNF- α INHIBITION AND APOPTOSIS
INDUCTION IN MACROPHAGES**

Fatiha Chellat^{1,2}, Yahye Merhi², Alain Moreau³, L'Hocine Yahia¹

¹ *Biomedical Engineering Institute, École Polytechnique of Montreal, Quebec, Canada*

² *Laboratory of experimental pathology, Montreal Heart Institute, Quebec, Canada*

³ *Sainte-Justine hospital research center, Montreal, Quebec, Canada*

Keywords : macrophages, nanoparticles, apoptosis, TNF- α inhibition, antisense oligodeoxynucleotides.

Corresponding authors:

Fatiha Chellat **and** L'Hocine Yahia

Biomedical Engineering Institute

Ecole Polytechnique of Montreal

C.P. 6079, succursale Centre-ville

Montreal (Québec); H3C 3A7, Canada

E.mail adresses: Fatiha.Chellat@polymtl.ca **and** Yahia@grbb.polymtl.ca

Tel. : +1 514 340 4711 ext. 4378; Fax.: +1 514 340 4611

6.1 Abstract

Nanoparticles formed by low, medium and high molecular weight (MW) Chitosan (Ch) and polyethyleneimine (PEI) were used for the complexation of plasmid DNA containing the pro-apoptotic Bax- α gene to induce apoptosis in THP-1 macrophages. In addition, nanoparticles loaded with antisense TNF- α oligodeoxynucleotides (ODN) were used to assess their inhibiting potential on TNF- α secretion. First, cell viability was assessed by the MTT test to determine the optimal conditions for the induction of macrophage mortality. The selected conditions were then used to assess apoptosis by flow cytometry using Annexin V-phycoerythrin (PE). After the stimulation of THP-1 by LPS, the cells were treated with the anti-TNF- α -loaded nanoparticles and the TNF- α secretion was determined by ELISA.

The results showed that PEI-Bax- α nanoparticles were more efficient in inducing apoptosis in THP-1 than Ch. However, medium and high MW PEIs were toxic and resulted in a dramatic decrease in cell viability. Low MW PEI-Bax- α nanoparticles reduced the cell viability to a higher extent than the polymer alone. On the other hand, the complexation of anti- TNF- α ODN with low MW PEI resulted in the diminution of TNF- α secretion by 15%.

The following experiments allowed us to conclude that this effect was specifically induced by Bax- α when complexed with PEI, mainly via apoptosis.

6.2 Introduction

The usefulness of cationic polymers as non-viral systems for gene delivery is dictated by their physicochemical properties, which allow the interaction with DNA and its condensation at the nanoscopic scale [1]. In addition, they display low toxicity and reduced immunogenic risks in comparison with viral systems, without the limitation of therapeutic gene size [2,3]. Economically speaking, non-viral systems are far less expensive than viral ones.

Among the cationic polymers, polyethyleimine (PEI) is known to be one of the most efficient systems. This is due to its capacity to buffer the endosome according to the sponge theory [4]. This results from the fact that only a fraction of its amino groups are protonated at the physiological pH. After their internalization by the cells and their capture into endosomal compartments that display an acidic pH, PEI acquires the capacity to capture protons. This causes osmotic swelling and subsequent endosome disruption, leading to the release of endocytosed DNA into the cytosol [5]. PEI has successfully been used for gene delivery without the use of any additional components [6-8]. It has also been modified to make it multifunctional and to give it more specific properties. Aiming to improve gene delivery to the cells, polymer segments or targeting moieties were grafted onto the polymer [9,10]. As examples, the incorporation of the epidermal growth factor or transferrin to PEI-DNA complexes resulted in up to 100-fold increase in gene expression in tumor cell lines [11,12]. Also, the incorporation of folic acid to PEI carriers was performed to allow a receptor-mediated endocytosis by

cancerous cells that possess folate receptors on their surface [9,13]. Cell-specific targeting using PEI was also achieved by coupling monoclonal antibodies to the polymer [14]. Another polymer that is used as a gene carrier is chitosan (Ch), which displays a very good biocompatibility, low immunogenicity and negligible cytotoxicity [15]. It has attracted attention regarding its capacity to compact DNA and protect it from degradation [16], and it has raised much interest in the development of vaccines [17].

In the present study, we report on the use of PEI and Ch as vectors for delivering plasmid DNA and oligodeoxynucleotides (ODN) to macrophages. A comparison is made between Ch and PEI in terms of cytotoxicity and mortality induction by apoptosis upon complexation with a plasmid containing the pro-apoptotic gene Bax- α . An investigation of the inhibitory effect of anti-TNF- α ODN after its complexation with PEI is also reported.

6.3 MATERIALS and METHODS

6.3.1 Nanoparticle synthesis

Chitosan and PEI having three molecular weights (low, medium, and high; i.e. 25, 750 and 1 000 kDa for PEI and 150, 400 and 600 kDa for chitosan) were purchased from Fluka Biochemika and used for the nanoparticle synthesis. Different concentrations were used during their fabrication (0.01, 0.02 and 0.05 % for Ch and 0.225, 0.45 and 0.9 mg/mL for PEI).

Ch-DNA complex formation was achieved by a complex coacervation technique [31]. The nanoparticles were prepared based on a method reported by Mao et al [32]. Briefly, a

chitosan stock solution (0.1%) was prepared by dissolving the polymer in 5 mM sodium acetate buffer, pH 5.5, and then filtered under sterile conditions. Plasmid DNA solution (100 µg/ mL) was prepared in 4.3 mM of sterile filtered sodium sulfate (Na_2SO_4) solution. 100 µl of each DNA and chitosan solutions were mixed together after preheating at 55°C, and then vortexed for 30 seconds.

PEI-DNA nanoparticles were prepared as previously described by Boussif et al. [5]. The PEI was dissolved in ultrapure deionized water to a concentration of 0.9 mg/mL. The pH of the stock solution was adjusted to 7.4 using chlorhydric acid (HCl). The solution was then sterilized through a 0.22 µm filter. All the following procedures for DNA and ODN complexation were carried out under rigorous sterile conditions.

6.3.2 Plasmids and Oligodeoxynucleotides

pORF-Bax- α was obtained from Biosource (Montreal, Canada), amplified in competent *Escherichia coli* DH5- α and purified according to Maniatis et al [33]. During the procedure, lithium chloride (LiCl) was used to obtain endotoxin free plasmids. DNA integrity and purity were ascertained by digesting 1 µg of DNA samples with 0.5 µl of Bam H1 and Not I restriction enzymes.

pORF-Bax- α was condensed by the different MW Ch and PEI at the concentrations listed above and the obtained nanocomplexes were used for the evaluation of apoptosis induction.

The 19-mer antisense ODN anti-TNF (5' -ATC AGG AAG GAG AAG AGG- 3') is complementary to the translation initiation site of human TNF mRNA (position 271 to 289) were obtained from Biosource (Montreal, Canada).

6.3.3 Cell culture:

THP-1 macrophages (American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD) were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat inactivated (1 h at 56°C) FBS (Gibco, BRL), 2 mM L-Glutamin and penicillin (100 units/mL)/streptomycin (100 ng/mL) and $5 \cdot 10^{-5}$ M of 2mercaptoethanol (Sigma, St Louis, MO, USA).

6.3.4 Cytotoxicity study:

THP-1 cells were seeded in 96-well culture plates at 5×10^4 cells/well and the cytotoxicity of Ch and PEI, each alone and complexed with plasmid DNA, was determined after 24 hours using the [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] (MTT) (Sigma) assay. This test was first described by Mosmann [34] and is based on the ability of a viable cell's mitochondrial dehydrogenase enzyme to cleave the tetrazolium rings. In our study, the cells were incubated with different concentrations of low, medium and high MW polymers. Concentrations consisted of 0.01, 0.02 and 0.05% for Ch and 0.223, 0.45 and 0.9 mg/mL for PEI. After the incubation period, cell viability was assessed according to the manufacturer's instructions. The medium was removed and replaced by a fresh one containing a 1:10 dilution of a 5 mg/mL MTT stock solution in PBS. The cells were incubated for an additional period of 4 hours after which the MTT-containing medium was removed and 100 μ l of isopropanol-HCl 0.1 N was added to each well. Absorbance was then assessed spectrophotometrically at 570 nm in a microplate reader (Power Wave x 340, Bio-Tek Instruments, Inc.). The results are expressed as optical density (OD), where the intensity is directly proportional to the number of living cells.

6.3.5 Apoptosis study

Based on the results of the cytotoxicity study, a concentration of 0.9 mg/mL low molecular PEI was selected for the complexation of Bax- α plasmid, which itself was

used at concentrations of 1 and 5 μg . The cells were incubated with the nanoparticles for 24 hours and then the apoptosis was assessed. Cell culture medium alone, Bax- α plasmid at 5 μM , PEI at 0.9 mg/mL as well as 100 μM formaldehyde, were used as controls. An Annexin V-phycoerythrin (PE) apoptosis detection kit (BD Biosciences Pharmingen) was used for the quantification of apoptotic cells by flow cytometry (Beckman Coulter, Epics Altra). In this kit, Annexin V was used in conjunction with 7-Amino-actinomycin (7-AAD) vital dye in order to detect viable cells (Annexin V-PE negative, 7-AAD negative), early apoptotic cells (Annexin V-PE positive, 7-AAD negative), as well as cells that are in late apoptosis or already dead (Annexin V-PE and 7-AAD positive).

6.3.6 TNF- α inhibition study

Before the treatment of the cells with anti-TNF- α -PEI nanoparticles, they were stimulated by 50 nM of lipopolysaccharide (LPS) for 4 hours. The medium was then removed and replaced with a fresh one. Thereafter, different concentrations of ODN (1, 5 and 10 μM) were complexed with PEI and used for the treatment of the cells. After 6 hours, the TNF- α secretion was determined by the Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA).

6.3.7 Statistical analyses

The experiments were repeated three times using different batches of nanoparticles and the analyses were performed in triplicate. Data are presented as mean \pm standard deviation. Statistical analyses were performed using *ANOVA* (*a one-way analysis of variance*), followed by Bonferroni *t*-test for comparison with the control group. Statistical significance was determined at $P < 0.05$.

6.4 RESULTS

6.4.1 DNA condensation with PEI and Ch

All PEI and Ch showed an efficient DNA condensation, regardless of their molecular weight or concentrations, as determined by the agarose gel retardation assay (Fig. 6.1).

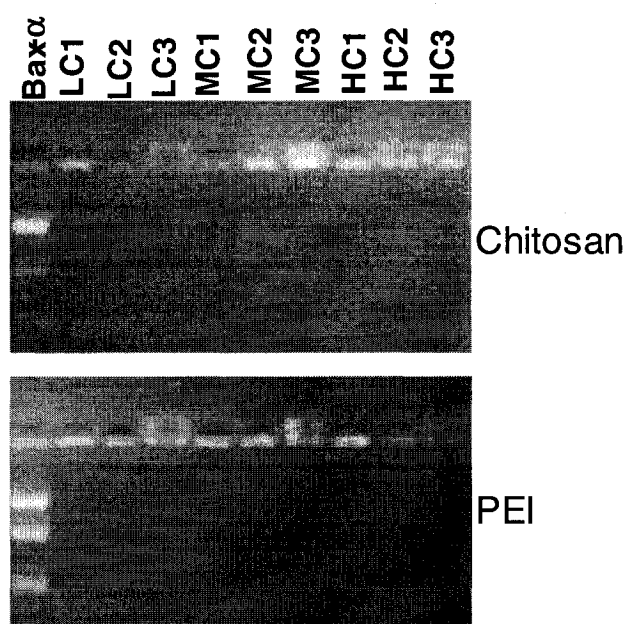


Figure 6.1 The Bax- α plasmid was condensed with Ch and PEI and the samples were loaded on a 1% agarose gel. Three different concentrations were used for each polymer (C1: 0.01%; C2: 0.02%; C3: 0.05% for Ch and C1: 0.25 mg/mL; C2: 0.45 mg/mL; C3: 0.9 mg/mL for PEI) with the different molecular weights (L: low MW; M: medium MW; H: high MW).

6.4.2 Cytotoxicity of PEI and Ch

The exposure of THP-1 cells to medium and high molecular weight PEI alone showed an evident cytotoxic effect after 24 hours. On the contrary, when low molecular weight PEI was used, no cytotoxic effect was found for all the concentrations. However, at the highest concentration (0.9 mg/mL), the complexation with Bax- α plasmid resulted in almost 50% decrease of cell viability (Fig. 6.2). This effect could be related to the induction of apoptosis by the Bax- α gene. A similar study showed that the effect of Ch alone was similar to that of Ch-Bax- α plasmid nanoparticles. That is, they had no significant effect on cell viability (Fig. 6.3).

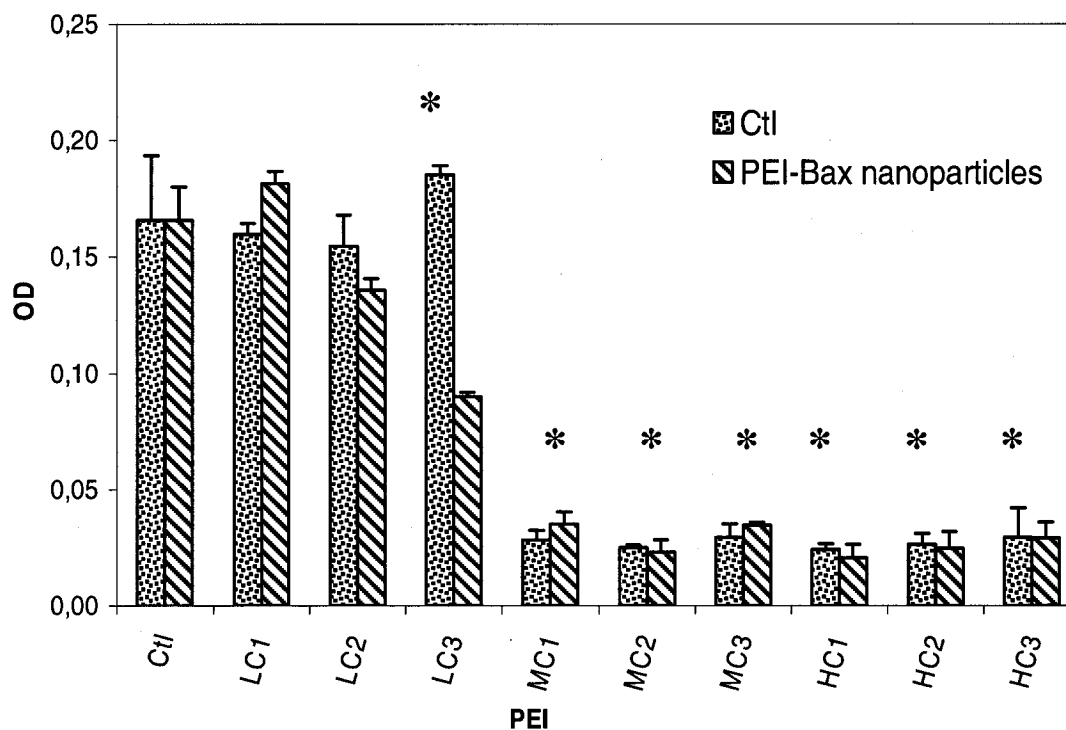


Figure 6.2 THP-1 cells were treated with different molecular weight PEI (L: low; M: medium; H: high) at three different concentrations (C1: 0.25 mg/mL; C2: 0.45 mg/mL; C3: 0.9 mg/mL). When the cells were incubated with PEI alone for 24 hours, no cytotoxic effect was induced at low molecular weight. On the contrary, at medium and high MW, a dramatic decrease in cell viability was shown. At low molecular weight and a concentration of 0.9 mg/mL, the complexation with Bax- α plasmid resulted in almost 50% decrease of cell viability (*: $P < 0.05$).

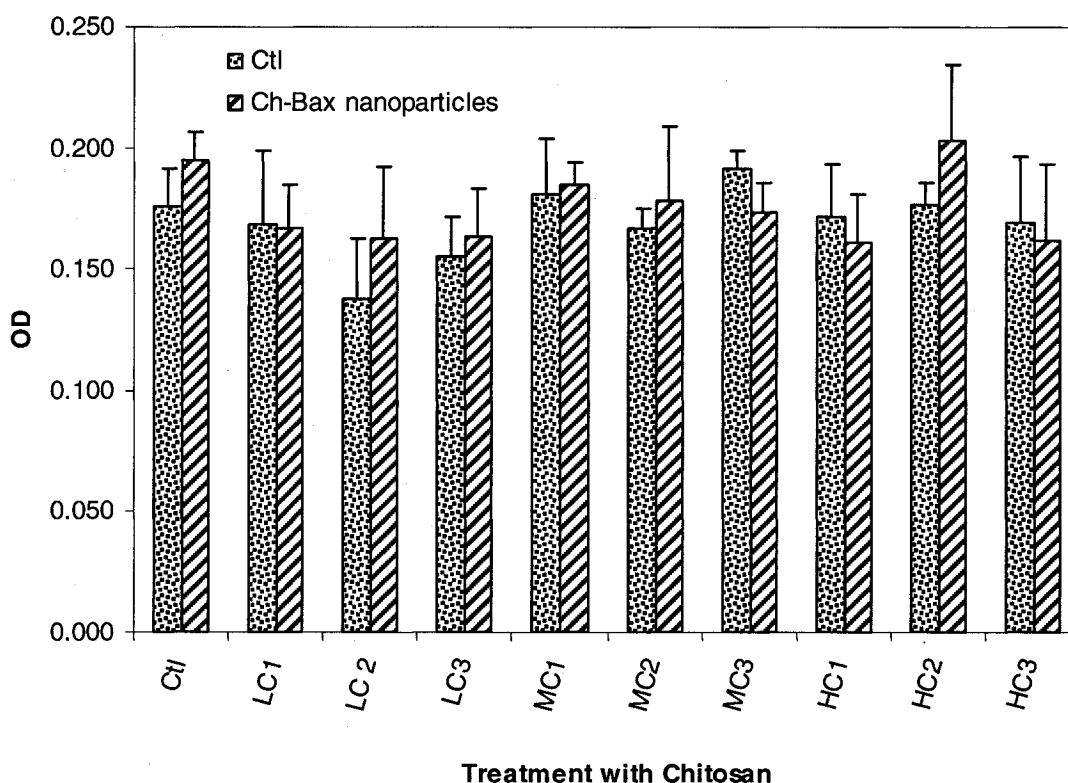


Figure 6.3 THP-1 cells were treated with different molecular weight Ch (L: low; M: medium; H: high) at three different concentrations (C1: 0.01%; C2: 0.02%; C3: 0.05%). No significant difference was seen in cell viability after the treatment of the cells with chitosan alone or complexed with Bax- α plasmid.

To select the optimal concentration of Bax- α for inducing high cell mortality during nanoparticle synthesis, PEI was used at 0.9 mg/mL while DNA concentration was varied (1 μ g, 2.5 μ g and 5 μ g). The results, shown in figure 4, indicate that the cell viability was decreased by complexing Bax- α plasmid with PEI, but no significant effect was observed by varying DNA concentration.

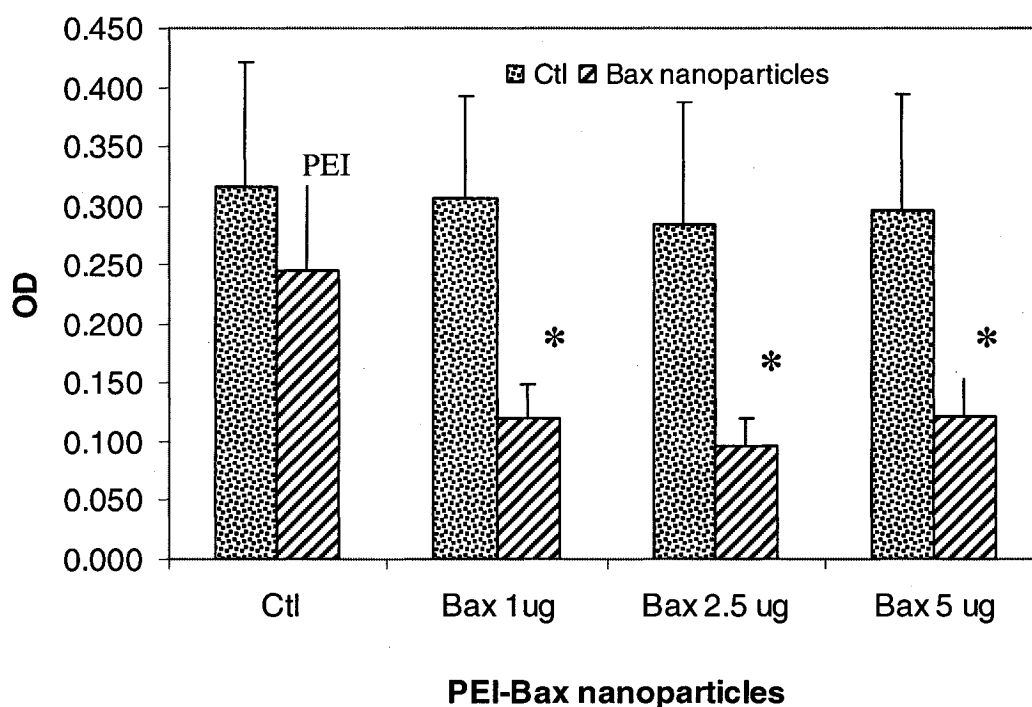


Figure 6.4 The THP-1 cells were treated with PEI- Bax- α nanoparticles. In this experiment the nanoparticles were made by varying the concentration of the plasmid, while the concentration of PEI was constant (0.9 mg/mL). The results indicate that the cell viability was decreased by complexing Bax- α plasmid with PEI, but no significant effect was observed by varying DNA concentration(*: $p < 0.05$).

6.4.3 Cell transfection and apoptosis induction

The DNA laddering experiment displayed no signs of DNA fragmentation after cell incubation with the different treatments. This assay, however, allowed the detection of the Bax- α plasmid, which remained intact upon complexation with PEI, after 24 hours incubation, while naked Bax- α seemed to be degraded (Fig. 6.5).

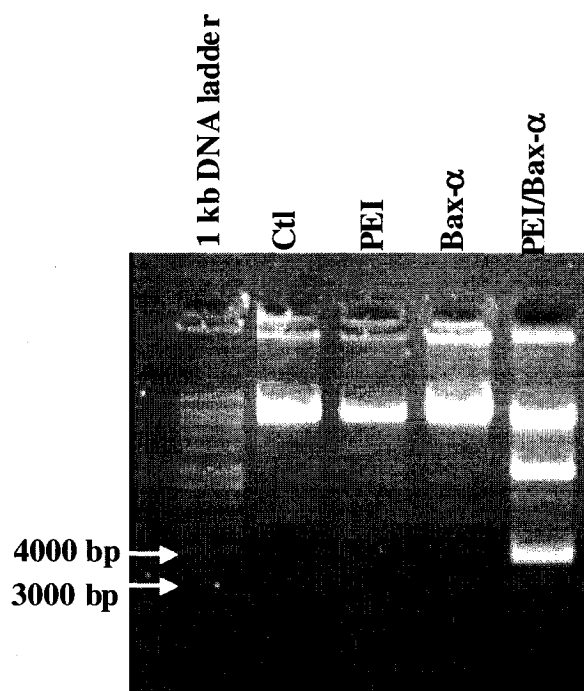


Figure 6.5 The DNA laddering technique did not show any DNA fragmentation of the THP-1 cells after treatment with the nanoparticles, PEI and Bax- α alone.

The assessment of apoptosis using the Annexin V-PE kit (Fig. 6.6) revealed that the incubation of the cells with formaldehyde, used as a positive control, induced 100% of cell death by apoptosis and 40% by necrosis. PEI alone induced 90% of cell mortality by apoptosis and less than 10% by necrosis. The nanoparticles formed by the complexation of 1 μ g of DNA with PEI, as well as uncomplexed DNA, showed the same effect as the negative control, which consisted of cell culture medium. Interestingly the nanoparticles made by the complexation of 5 μ g of Bax- α plasmid induced up to 70% of THP-1 apoptosis.

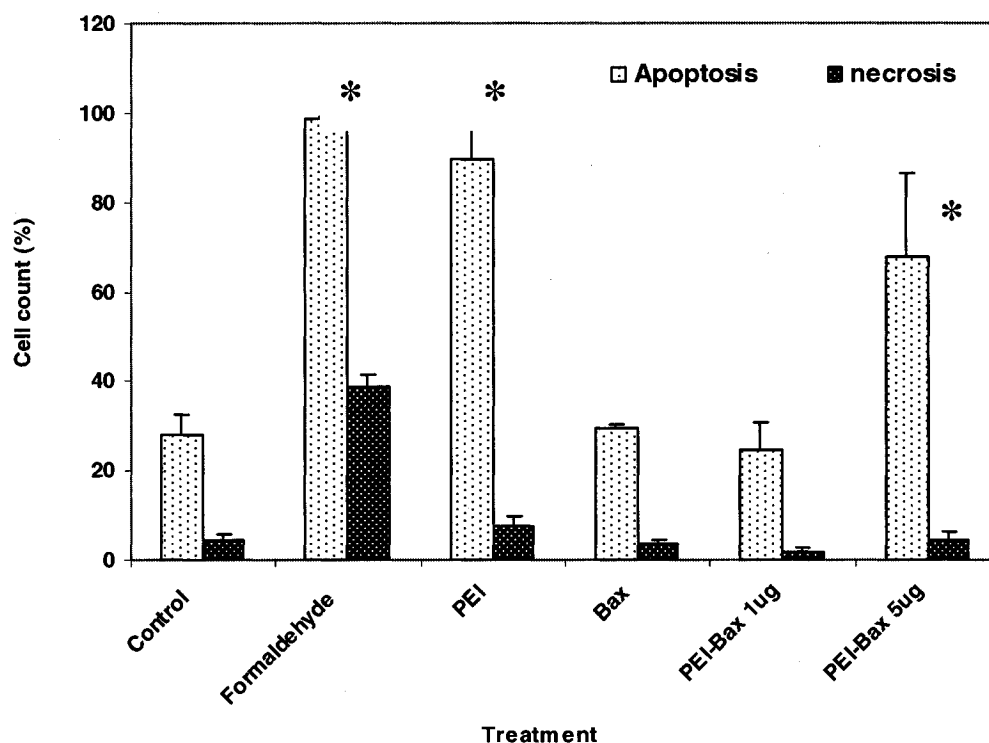


Figure 6.6 Annexin V-PE kit was used for the detection of apoptosis at earlier stage by flow cytometry. When 5 μ g of DNA was complexed with PEI, the apoptosis rate was 2-fold higher than that of the control and Bax- α alone (*: $p < 0.05$).

6.4.4 TNF- α inhibition

After treatment of the cells with LPS and a subsequent addition of anti-TNF- α nanoparticles (1 and 5 μ M), the secretion of TNF- α decreased by 15% in comparison to the positive control, where the cells were treated with 50 nM of LPS without the addition of the nanoparticles. Treatment of the cells with anti-TNF- α ODN alone at a concentration of 5 μ M resulted in a decrease of 6% in cytokine secretion. Treatment of the cells with PEI did not significantly increase the amount of TNF- α in the cell supernatants (Fig. 6.7).

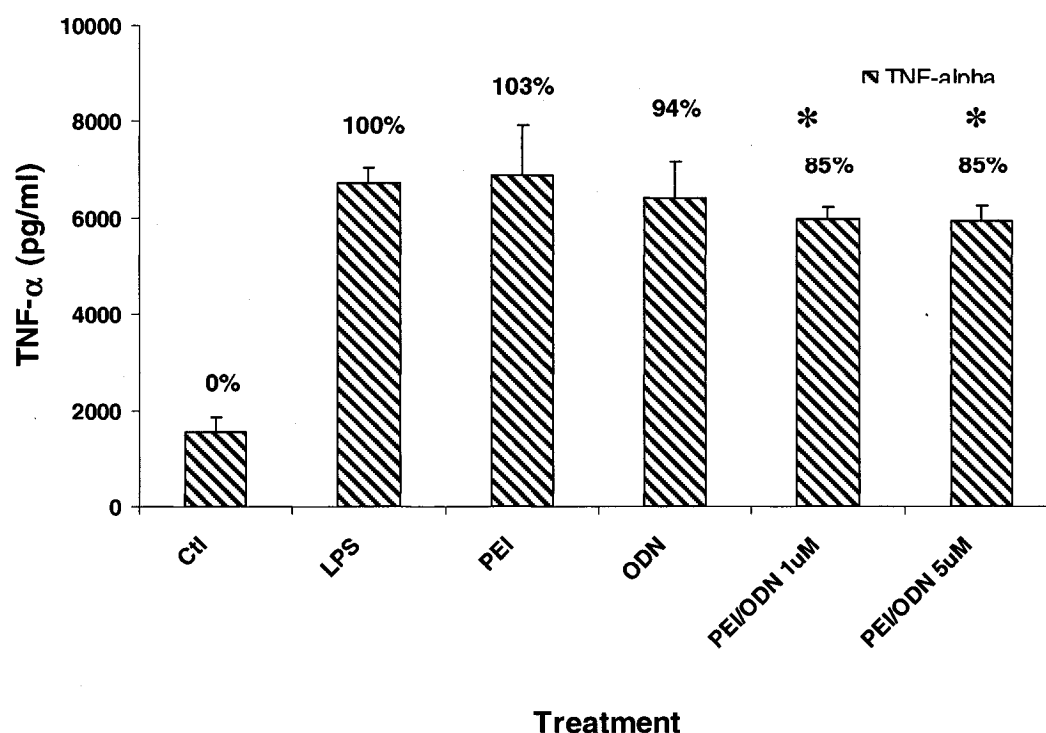


Figure 6.7 The results show that TNF- α secretion was inhibited by 15% after a complexation with PEI, while this effect was not observed when the ODNs were used in naked form (*: $p < 0.05$).

6.5 Discussion

Since the cell membrane constitutes a barrier to the delivery of therapeutic nucleic acids [22], charge neutralization and condensation of the nucleic acids into small particles is necessary to improve their cell uptake by endocytosis [23]. In the present work we used two polycationic polymers (Ch and PEI) for the condensation of a plasmid DNA containing the Bax- α gene. The fabricated nanoparticles were then used to target the THP-1 macrophage cell line in order to induce their apoptosis. The rationale of using Bax- α to induce apoptosis in macrophages was based on the involvement of these cells in many inflammatory diseases. In fact, macrophage activation has been demonstrated to

play an important role in the pathogenesis of some delayed-type hypersensitivity as well as autoimmune and inflammatory diseases. Therefore, macrophages represent good candidates as cell targets for immunosuppressive and anti-inflammatory drugs. It has been proposed that the induction of apoptosis in these cells partially contributes to the inhibition of inflammation and enhances the treatment of rheumatic diseases by immunosuppressive drugs [24,25]. In fact, an increase in the production of hematopoietic effector cells is well established during inflammation [26,27].

Apoptosis occurs by two major pathways: the death-receptor-induced extrinsic pathway and the mitochondria-apoptosome-mediated apoptotic intrinsic pathway. Both of these pathways lead to caspase activation and cleavage of specific cellular substrates. Bcl-2 family members are central regulators of apoptosis and play a pivotal role in cell death or survival fate [28]. They exert their effects essentially at the level of the mitochondria, leading to a permeability of its membrane and a release of cytochrome C [29]. Bcl-2 family proteins are composed of two opposite subtypes: anti-apoptotic and pro-apoptotic proteins. The switching on and off of apoptosis is determined, at least in part, by the ratio between the two subsets [30]. The predominant expression of anti-apoptotic Bcl-2 family members relative to that of pro-apoptotic members has been shown to be implicated in the pathogenesis of inflammatory diseases, such as the rheumatoid arthritis (RA) [31]. During this pathogenesis, Bcl-2 is more highly expressed in synovial tissue and is located at the sites of early erosion, and it has been correlated with scores for erosion and inflammation [32]. This has also been associated with insufficient apoptosis of synovial macrophages especially in early RA [33,34].

Bax belongs to the pro-apoptotic subtype. It is widely expressed in tissues, including in a number of sites at which cells die during normal maturation [35], and it has been shown to be essential for programmed cell death [36]. Direct evidence of the role of Bax in neutrophil apoptosis was provided by using Bax antisense ODNs, which provoked a delay in this process. Both granulocyte expansion and the resolution of inflammation appeared to be regulated by the expression of the Bax gene in neutrophils. The anti-

apoptotic pathway has been shown to be mediated by cytokines; as a consequence of cytokine action, this led to a reduction in Bax levels, allowing neutrophil expansion under inflammatory conditions [37]. Liu et al. examined the effect of Bax deficiency in bone marrow-derived leukocytes on the development of atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-null (LDLR^{-/-}) mice. Cross sections of proximal aorta showed a 49.2% increase in the mean lesion area of the Bax^{-/-} group in comparison with the wild type group. In addition, they found a 53% decrease in apoptotic macrophages for the Bax^{-/-} group. Their results led to the conclusion that the reduction of apoptotic activity in macrophages stimulates atherosclerosis in LDLR^{-/-} mice, which is consistent with the hypothesis that macrophage apoptosis suppresses the development of atherosclerosis [38].

In this work, we first compared the effect of Ch- and PEI-Bax- α nanoparticles on THP-1 cell viability using the MTT test, in order to establish the optimal synthesis conditions for inducing cell mortality. Ch and PEI showed a comparative success in DNA condensation (Fig. 6.1). Since the efficiency as well as the cytotoxicity of PEI is closely related to the molecular weight [39], we investigated the effect of MW on cell viability using commercially available PEIs. The treatment of the cells with medium and high MW PEI showed a significant induction of mortality (Fig. 6.2) while Ch did not affect the cell viability upon complexation with Bax- α (Fig. 6.3).

Our results are in agreement with the study of Godbey et al. [7] who demonstrated that, at a molecular weight above 25 kDa, PEI displays an important cytotoxic effect. Indeed, the use of medium and high MW PEI resulted in a dramatic decrease in cell viability, while at low MW, this effect was slight (Fig. 6.3).

Based on these results, Ch and the highest MW PEIs were discarded. Only PEI with low MW was used for the studies of Bax- α -mediated apoptosis induction and TNF- α inhibition in THP-1 cell line.

Previous to the apoptosis study, the cell viability was determined after treatment with PEI-Bax- α nanoparticles, PEI alone and the plasmid alone. During the nanoparticle synthesis, the concentration of Bax- α plasmid was varied while the volume and the concentration of PEI were kept constant. As assessed by the MTT test, cell viability was significantly affected after treatment with PEI-Bax- α nanoparticles, but the difference was not statistically significant between nanoparticles of Bax- α varying concentrations (Fig.4). Regarding the controls, PEI induced a statistically significant decrease in cell viability, while the Bax- α plasmid alone showed the same effect on the cell viability as the negative control (medium alone) (Fig. 6.4).

The efficacy of a transient expression of Bax to induce apoptosis was shown for various human ovarian carcinoma cell lines as well as primary ovarian cancer cells. In a study by Xiang et al., gene transfer was achieved using an inducible recombinant Bax adenovirus [40]. In our study, a Bax- α -containing plasmid was complexed with PEI and its effect on the induction of apoptosis in THP-1 was firstly investigated by the DNA laddering technique. The results did not show any DNA fragmentation (Fig. 6.5) that is characteristic of the late stages of the apoptosis process. The plasmid was found in intact form when it was complexed with PEI (Fig. 6.5, line 5), yet it was not evident in the DNA cell extracts when used in naked form (Fig. 6.5, line 4). These results confirm the internalization of the plasmid by the cells and the protective effect of PEI from nuclease degradation of the Bax- α plasmid once inside the cells.

To detect apoptosis at earlier stages, we used the Annexin V-PE kit [41]. The flow cytometry study showed that, when 5 μ g of DNA was complexed with PEI, the apoptosis rate was 2-fold higher than that of the control and Bax- α alone. However, PEI alone induced a high apoptosis effect, while the results obtained using Bax- α alone or complexed with PEI at the concentration of 1 μ g were similar to that of the control (untreated cells) (Fig. 6.6). This attests that the complexation of PEI with the DNA resulted in a decrease of PEI-induced cell mortality. Similar findings were reported in a study using a poly ((2-dimethylamino) ethyl methacrylate) (PDMAEMA) for plasmid

condensation; where the cytotoxic effect of PDMAEMA was reduced upon complexation [42]. Given the fact that a constant volume of PEI at a constant concentration was used for the complexation of Bax- α plasmid (1 μ g and 5 μ g in the same volume), we concluded that the increased rate of cell apoptosis that was induced using 5 μ g-complexed DNA was mostly due to the efficiency of the nanoparticles synthesized in this condition.

The second part of this work consisted of anti-TNF- α - ODN nanoparticle targeting to the THP-1, since the use of antisense ODNs has shown promise in modulating gene expression [43]. More interestingly, TNF- α has been shown to play an important role in cell resistance to apoptosis [44]. This makes the anti-TNF- α therapy a useful tool for apoptosis induction in monocyte/macrophage lineage [45].

In the present study we used antisense TNF- α to modulate the secretion of the cytokine. The results showed that TNF- α secretion was inhibited by 15% after a complexation with PEI, while this effect was not observed when the ODNs were used in naked form (Fig. 6.7). This attests the effectiveness of PEI for the potentiation of the anti-TNF- α ODN effect. Another study used anti-TNF- α ODN to inhibit the production of the cytokine: in their paper, Tschoep et al. [46] succeeded in inhibiting TNF- α secretion by 62% in human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) by applying shock waves to the cells. But it must be underlined that the cells were stimulated by 10 nM of LPS, compared to 50 nM in our study. In addition, they used a 10 to 50-fold higher concentration of ODN. Moreover, this physical technique allows the ODN to enter directly into the cytoplasm without exposing of the nucleic acid to the endosomal environment. Another explanation for the lower percentage of TNF- α inhibition in our experiments could be the lack of dissociation of the ODN from the PEI.

6.6 Conclusion

The natural tendency of macrophages to migrate to diseased tissue sites, in response to the release of cytokines/chemokines, makes them a useful target for gene delivery

systems. In fact, this approach may prove to be promising as a treatment for many diseases, especially inflammatory-based ones, such as rheumatoid arthritis.

This work indicates that PEI is a more potent polymeric vehicle for nucleic acids than Ch. However, PEI was demonstrated to mediate substantial cytotoxicity, especially when used at a MW above 25 kDa. It should thus be used cautiously and its MW should be selected with care. That said, low MW PEI seems to be most suitable for gene delivery to THP-1 cell line. However, given the fact that macrophages are too difficult to transfect, due to their enzymatic and degradation power, non-viral systems remain to be improved. It should be mentioned that different modifications and conjugations have been applied to PEIs in order to give them specific properties (reviewed in reference [49]). One application of improved PEI systems could be to use a combination of anti-TNF therapy and apoptosis induction as an effective therapy for inflammatory diseases.

6.7 Acknowledgments

This work was supported in part by The Montreal Heart Institute Foundation. F. Chellat received a fellowship from MENTOR, a training program in mobility and posture disorders, of Canadian Institutes of Health Research (CIHR). The authors would like to thank Dr. M. Sirois for the anti-TNF-alpha ODN selection, Isabelle for her help with the flow cytometry analyses and S. Tam for reviewing the manuscript.

6.9 References

1. Dunlap DD, Maggi A, Soria MR, Monaco L. Nanoscopic structure of DNA condensed for gene delivery, *Nucleic Acids Res* 1997; 25:3095-3101.

2. Luo D, Saltzman WM. Synthetic DNA delivery systems. *Nat Biotechnol* 2000;18:33-37.
3. Romano G, Michell P, Pacilio C, Giordano A. Latest developments in gene transfer technology: achievements, perspectives, and controversies over therapeutic applications. *Stem Cells* 2000;18:19-39.
4. Tang MX, Szoka FC. The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes. *Gene Ther* 1997;4:823-832.
5. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:7297-7301.
6. Demeneix B, Behr J, Boussif O, Zanta MA, Abdallah B, Remy J. Gene transfer with lipospermines and polyethylenimines. *Adv Drug Deliv Rev* 1998;30:85-95.
7. Godbey WT, Wu KK, Hirasaki GJ, Mikos AG. Improved packing of poly(ethylenimine)/DNA complexes increases transfection efficiency. *Gene Ther* 1999;6:1380-1388.
8. Diebold SS, Kursu M, Wagner E, Cotton M, Zenke M. Mannose polyethylenimine conjugates for targeted DNA delivery into dendritic cells. *J Biol Chem* 1999;274:19087-19094.
9. Bennis JM, Mahato RI, Kim SW. Optimization of factors influencing the transfection efficiency of folate-PEG-folate-graft-polyethylenimine. *J Control Release* 2002;79:255-269.
10. Akiyama Y, Harada A, Nagasaki Y, Kataoka K. Synthesis of poly(ethylene glycol)-*block*-poly(ethylenimine) possessing an acetal group at the PEG end. *Macromolecules* 2000;33:5841-5845.
11. Blessing T, Kursu M, Holzhauser R, Kircheis R, Wagner E. Different strategies for Formation of PEGylated EGF-conjugated PEI/DNA complexes for targeted gene delivery. *Bioconjug Chem* 2001;12:529-537.

12. Kircheis R, Kichler A, Wallner G, Kursa M, Ogris M, Felzmann T, Buchberger M., Wagner E. Coupling of cell-binding ligands to polyethylenimine for targeted gene delivery. *Gene Ther* 1997;4:409-418.
13. Campbell IG, Jones TA, Foulkes WD, Trowsdale J. Folate-binding protein is a marker for ovarian cancer. *Cancer Res* 1991;51:5329-5338.
14. Strehblow C, Schuster M, Moritz T, Kirch HC, Opalka B, Petri JB. Monoclonal antibody-polyethyleneimine conjugates targeting Her-2/neu or CD90 allow cell type-specific nonviral gene delivery. *J Control Release* 2005;102:737-747.
15. Richardson SC, Kolbe HV, Duncan R. Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA. *Int J Pharm* 1999;178:231-243.
16. Cui Z, Mumper RJ. Chitosan-based nanoparticles for topical genetic immunization. *J Control Release* 2001;75:409-419.
17. Illum L, Jabbal-Gill I, Hinchcliffe M, Fisher AN, Davis SS. Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;51:81-96.
18. Truong-Le VL, August JT, Leong KW. Controlled gene delivery by DNA-gelatin nanospheres. *Hum gene ther* 1998;9:1709-1717.
19. Mao HQ, Roy K, Truong-Le VL, Janes KA, Lin KY, Wang Y, August JT, Leong KW. Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. *J Control Release* 2001;70:399-421.
20. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning: A laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, N.Y., 1986.
21. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
22. Zabner J, Fasbender AJ, Moninger T, Poellinger KA, Welsh MJ. Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J Biol Chem* 1995;270:18997-19007.

23. Gao X, Huang L. Potentiation of cationic liposome-mediated gene delivery by polycations. *Biochemistry* 1996;35:1027-1036.
24. Green AM, Steinmetz ND. Monitoring apoptosis in real time. *Cancer J* 2002;8:82-92.
25. Choi YJ, Kim TG, Kim YH, Lee SH, Kwon YK, Suh SI, Park JW, Kwon TK. Immunosuppressant PG490 (triptolide) induces apoptosis through the activation of caspase-3 and down-regulation of XIAP in U937 cells. *Biochem Pharmacol* 2003;66:273-280.
26. Malech HL, Gallin JI. Current concepts: immunology. Neutrophils in human diseases. *N Engl J Med* 1987;317:687-694.
27. Haslett C, Savill JS, Meagher L. The neutrophil. *Curr Opin Immunol* 1989;2:10-18.
28. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999;13:1899-1911.
29. Reed JC, Kroemer G. Mechanisms of mitochondrial membrane permeabilization. *Cell Death Differ* 2000;7:1145.
30. Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993;74:609-619.
31. Perlman H, Georganas C, Pagliari L, Koch AE, Haines K III, Pope RM. Bcl-2 expression in synovial fibroblasts is essential for maintaining mitochondrial homeostasis and cell viability. *J Immunol* 2000;164:5227-5235.
32. Perlman H, Liu H, Georganas C, Koch AE, Shamiyeh E, Haines GK III, Pope RM. Differential expression pattern of the antiapoptotic proteins, Bcl-2 and FLIP, in experimental arthritis. *Arthritis Rheum* 2001;44:2899-2908.
33. Pope RM. Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 2002;2: 527-535.

34. Catrina AI, Ulfgren AK, Lindblad S, Grondal L, Klareskog L. Low levels of apoptosis and high FLIP expression in early rheumatoid arthritis synovium. *Ann Rheum Dis* 2002;61:934-936.
35. Krajewski S, Krajewska M, Shabaik A, Miyashita T, Wang HG, Reed JC. Immunohistochemical determination of *in vivo* distribution of Bax, a dominant inhibitor of Bcl-2. *Am J Pathol* 1994;145:1323-1336.
36. Lindsten T, Ross AJ, King A, Zong W, Rathmell JC, Shiels HA, Ulrich E, Waymire KG, Mahar P, Frauwirth K, Chen Y, Wei M, Eng VM, Adelman DM, Simon MC, Ma A, Golden JA, Evan G, Korsmeyer SJ, MacGregor GR, Thompson CB. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members Bak and Bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell* 2000;6:1389-1399.
37. Dibbert B, Weber M, Nikolaizik WH, Vogt P, Schöni MH, Blaser K, Simon H-U. Cytokine-mediated Bax deficiency and consequent delayed neutrophil apoptosis: A general mechanism to accumulate effector cells in inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:13330-13335.
38. Liu J, Thewke DP, Su YR, Linton MF, Fazio S, Sinensky MS. Reduced macrophage apoptosis is associated with accelerated atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-null mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:174-179.
39. Godbey WT, Wu KK, Mikos AG. Size matters: molecular weight affects the efficiency of poly(ethylenimine) as a gene delivery vehicle. *J Biomed Mater Res* 1999;45:268-275.
40. Xiang J, Gómez-Navarro J, Arafat W, Liu B, Barker SD, Alvarez RD, Siegal GP, Curiel DT. Pro-apoptotic treatment with an adenovirus encoding *Bax* enhances the effect of chemotherapy in ovarian cancer. *J Gene Med* 2000;2:97-106.
41. Schmid I, Uittenbogaart CH, Keld B, Giorgi JV. A rapid method for measuring apoptosis and dual-color immunofluorescence by single laser flow cytometry. *J Immunol Methods* 1994;170:145-157.

42. Cherng JY, van de Wetering P, Talsma H, Crommelin DJ, Hennink WE. Effect of size and serum proteins on transfection efficiency of poly ((2-dimethylamino)ethyl methacrylate)-plasmid nanoparticles. *Pharm Res* 1996;13:1038-1042.
43. Agrawal S. Antisense oligonucleotides: towards clinical trials. *Trends Biotechnol* 1996;14:376-387.
44. Chen KH, Jurgens J, Liu HT, Pope RM. NF- κ B regulation of Flip: potential role in rheumatoid arthritis synovial fibroblast resistance to TNF α -induced apoptosis. *Arthritis Rheum* 2002;46:S602.
45. Lügering A, Schmidt M, Lügering N, Pauels HG, Domschke W, Kucharzik T. Infliximab induces apoptosis in monocytes from patients with chronic active Crohn's disease by using a caspase-dependent pathway. *Gastroenterology* 2001;121:1145-1157.
46. Tschoep K, Hartmann G, Jox R, Thompson S, Eigler A, Krug A, Erhardt S, Adams G, Endres S, Delius M. Shock waves: a novel method for cytoplasmic delivery of antisense oligonucleotides. *J Mol Med* 2001;79:306-313.
47. Kichler A. Gene transfer with modified polyethylenimines. *J Gene Med* 2004;6:S3-S10.

CHAPITRE VII

7. DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

La thérapie génique non virale bénéficie d'un intérêt croissant comme alternative à la thérapie génique virale qui est connue pour provoquer des problèmes tels que l'immunogénécité, toxicité, mutagénécité et un danger potentiel d'oncogénécité (Merdan et al., 2002).

Les polymères polycationiques représentent un support et véhicule de choix à cause de leur structure et propriétés qui permettent de se lier aux acides nucléiques pour former des complexes (polyplexes), dans lesquels les acides nucléiques sont condensés et protégés de la dégradation par les nucléases. De plus, cette complexation permet à l'ADN d'être internalisé plus facilement par la cellule dont la membrane est chargée négativement; ce qui constitue une barrière à l'acheminement des acides aminés -eux aussi chargés négativement- au niveau de la cellule. Ce premier défi est suivi par celui que représente le mouvement intracellulaire des nanoparticules, à savoir leur libération du compartiment endosomal, leur transport dans le cytoplasme et l'accès au noyau.

Lors de notre travail nous avons utilisé deux polymères polycationiques, le chitosane et le polyéthylèneimine (Ch et PEI) pour la formation de complexes avec l'ADN et les oligonucléotides (ODN). Les nanoparticules obtenues suite à la formation des complexes sont, en moyenne, de 75 nm avec le Ch et 160 nm avec le PEI; ce qui permet leur internalisation facile par les cellules.

Le choix du Ch est dicté par sa biocompatibilité et ses propriétés physico-chimiques qui ont fait de lui un candidat pour plusieurs applications dans le domaine biomédical. Son utilisation comme système de libération de gènes remonte à l'année 1998.

Quoique la biocompatibilité du PEI reste controversée, son efficacité ne laisse plus de doute à cause de ses propriétés physico-chimiques (voir chapitre 2). D'ailleurs, des systèmes de transfection de cellules sont commercialisés et disponibles à des fins de recherche en laboratoire. Son utilisation pour véhiculer des gènes remonte à 1995 et des efforts sont déployés pour améliorer sa biocompatibilité. Malheureusement, il s'est avéré que la diminution de la cytotoxicité est souvent accompagnée par une diminution d'efficacité (Brownlie et al., 2004).

Il est connu que les macrophages sont les premières cellules susceptibles d'internaliser les nanoparticules, suite à leur administration intraveineuse. Il est aussi connu que le recrutement des macrophages et leur activation sont des événements impliqués dans le développement de différentes lésions pathologiques (tumeurs malignes, plaques d'athérosclérose, arthrite etc.) (Chapitre 3). De plus ils constituent un réservoir pour les agents pathogènes qui se propagent et étendent l'infection.

Ce travail de doctorat a donc porté sur l'utilisation des nanoparticules pour cibler les macrophages, compte tenu des effets thérapeutiques qui peuvent en résulter (Chapitre 3).

Une remarque frappante nous a mené à explorer les conséquences de l'internalisation des nanoparticules par les macrophages. Elle consiste dans le fait que malgré l'énorme développement dans le domaine des systèmes nanoparticulaires -développés pour cibler les macrophages ou d'autres types cellulaires et tissus-, très peu de travail est publié sur les effets provoqués suite à leur internalisation par les macrophages.

Donc, la première étape du travail a consisté à utiliser les nanoparticules de Ch renfermant un plasmide VR1412 avec un gène marqueur codant pour la protéine β -galactosidase et ayant fait l'objet d'un travail préalable publié dans la revue Biomaterials en 2003 (Corsi et al.) (annexe 1).

Notre hypothèse de travail s'est basée sur le fait que les nanoparticules sont des corps étrangers, qui une fois administrées *in vivo* sont susceptibles d'induire des réponses de l'hôte, où les macrophages jouent un rôle central.

Nous avons donc procédé à l'évaluation de la sécrétion des cytokines et des métalloprotéinases (MMPs) qui sont connues pour induire des effets délétères, au niveau des tissus, et qui pourrait être induite par l'incubation et l'internalisation des nanoparticules par les macrophages.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'internalisation des nanoparticules de Ch-ADN marquées au FITC, en utilisant la cytométrie en flux et la microscopie de fluorescence. Ces études ont révélé que les nanoparticules de Ch-ADN se retrouvent à l'intérieur des macrophages après une heure d'incubation (figure 5.1 et 5.2).

Malgré l'augmentation du nombre de nanoparticules dans les cellules en fonction du temps d'incubation (1, 6 et 24 heures), l'activité inflammatoire inhérente aux cellules ne semble pas avoir été stimulée. En effet, suite à l'incubation des macrophages avec différentes concentrations de nanoparticules, la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires, TNF- α , l'IL-1 β et l'IL-6, ainsi que la cytokine anti-inflammatoire IL-10, n'est pas significativement affectée, comparativement aux cellules non traitées. Les seuls résultats démontrant que la sécrétion des cytokines a augmenté ont été obtenus après traitement des cellules par le LPS, connu pour son effet stimulateur et utilisé comme témoin positif dans nos études (tableau 5.1).

Une autre étude effectuée par Scholer et al. (2002) a démontré que l'augmentation de la concentration des nanoparticules a provoqué une augmentation de la cytotoxicité et de la sécrétion de cytokines chez les macrophages. Mais il faut souligner que lors de leur étude, ils ont utilisé des nanoparticules lipidiques, ce qui permet de croire que les nanoparticules à base de Ch sont moins toxiques et provoquent moins de réaction inflammatoire.

Lors des maladies inflammatoires, les macrophages activés sécrètent des MMPs qui jouent un rôle dans la dégradation de la matrice extracellulaire (Overall, 2001) et conduisent à la destruction des tissus environnants. La production des MMPs a été démontrée pour être d'une importance majeure dans la pathologie de différentes maladies telles que le cancer (Saito et al., 2000; Coussens et al., 2000; Inuzuka et al., 2000), l'asthme (Mautino et al., 1997 ; Cataldo et al., 2001) et l'arthrite rhumatoïde (Klimiuk et al., 1999; Jovanovic et al., 2000). Les MMPs sont aussi impliquées dans la régulation des processus biologiques; c'est le cas notamment pour la MMP-2 dans l'ostéogénèse (Martignetti et al., 2001).

Nous avons alors procédé au dosage des MMP-9 et MMP-2, connues pour leur activité gélatinolytique, ainsi que leurs inhibiteurs (TIMP-1 et TIMP-2). Le but de cette expérience était de détecter l'existence d'un déséquilibre entre la sécrétion des enzymes et de leurs inhibiteurs, généralement observé au cours des dommages tissulaires et des maladies inflammatoires (Mautino et al., 1999).

Deux techniques ont été utilisées pour mesurer l'activité gélatinolytique : la technique ELISA, comme pour les cytokines et la technique de zymographie dont le principe consiste à faire digérer la gélatine contenue dans des gels d'acrylamide.

L'analyse effectuée par la technique ELISA a montré que l'internalisation des nanoparticules de Ch-ADN par les macrophages a provoqué une forte augmentation de la MMP-9 après 24 et 48 heures. Cette augmentation est observée pour toutes les concentrations de nanoparticules utilisées (figure 5.3a). Les résultats concernant la sécrétion de la MMP-2 sont différents; l'augmentation de la MMP-2 est observée seulement après 48 heures pour les 2 concentrations les plus élevées de nanoparticules (10 et 20 μ g d'ADN total) (figure 5.3b). Ceci n'est pas surprenant, car la stimulation de la MMP-9 ne se produit pas de la même façon pour la MMP-2. Dans leur travail Robinson

et ses collaborateurs (2002) ont montré que le traitement des monocytes sanguins périphériques par les chemokines a provoqué l'augmentation de la MMP-9, alors qu'aucun changement ne s'est produit dans la sécrétion de la MMP-2.

Par ailleurs, l'analyse densitométrique des zymogrammes obtenus par la technique de zymographie, visant à déterminer l'activité des MMPs contenues dans les surnageants cellulaires, a permis de montrer que l'activité de la MMP-9 est augmentée après 24 heures, indépendamment de la concentration des nanoparticules, confirmant ainsi les résultats obtenus par la technique ELISA (figure 5.4a). Par contre, l'activité de la MMP-2, après traitement avec les nanoparticules, est similaire à celle des surnageants des cellules non traitées, indépendamment de la concentration des nanoparticules ou des temps d'incubation (figure 5.4c).

L'analyse de l'activité des MMP-2 et MMP-9 dans les lysats cellulaires a montré que l'activité de la MMP-9 est augmentée après 48 heures, suite au traitement des cellules avec les plus hautes concentrations de nanoparticules (10 et 20 μg d'ADN total). Par contre, la détection de la MMP-2 n'a pu être observée. Un fait important à signaler, est la présence d'une bande de 92 kDa, correspondant à la MMP-9 active, qui a pu être mise en évidence dans les lysats cellulaires (figure 5.5), alors qu'elle est absente dans les surnageants. Cette observation pourrait être due à la phagocytose des nanoparticules et à une tentative de leur dégradation par les enzymes cellulaires, plutôt qu'à un effet inflammatoire. Cette supposition est étayée par l'absence de détection du TNF- α , lors de l'analyse par ELISA, or le TNF- α est connu pour augmenter la production de la MMP-9 dans les THP-1 (Leber et Balkwill, 1998). Ceci a aussi été mis en évidence en inhibant le TNF- α , conduisant à la prévention de la sécrétion de la MMP-9 par les THP-1 (Robinson et al., 2002).

Cependant, cette hypothèse reste à démontrer et mérite des études ultérieures, pour élucider les mécanismes par lesquels la MMP-9 est modulée, suite à l'incubation et l'internalisation des nanoparticules par les macrophages.

La production des inhibiteurs de la MMP-9 et de la MMP-2, respectivement TIMP-1 et TIMP-2, a été mesurée suite à l'incubation des THP-1 avec les nanoparticules de Ch-ADN. Cette étude a été réalisée afin de déterminer la présence potentielle d'un déséquilibre entre la production des MMPs et des TIMPs. Les résultats obtenus par dosage ELISA ont montré l'absence de la sécrétion de TIMP-2, inhibiteur de MMP-2, alors que la production de TIMP-1, inhibiteur de MMP-9, s'est trouvée augmentée après 24 et 48 heures, suite au traitement avec les deux concentrations les plus élevées de nanoparticules (figure 5.3). Ceci démontre une corrélation entre la sécrétion des MMPs et des TIMPs.

En conclusion à cette partie de travail sur les effets des nanoparticules de Ch-ADN, nous pouvons dire que les conditions utilisées n'ont pas induit d'effet inflammatoire. Par ailleurs, il reste à faire la corrélation entre la présence intracellulaire de la MMP-9 active et la sécrétion de son inhibiteur TIMP-1 avec la phagocytose et la dégradation des nanoparticules internalisées par les THP-1. Des études au niveau transcriptionnel pourraient nous donner des informations concernant la régulation de ces molécules.

Finalement, la compréhension des interactions entre les vecteurs d'ADN non viraux et les macrophages est une étape nécessaire dans le développement et l'optimisation de systèmes thérapeutiques pour cibler les macrophages. Notre travail a permis de mettre en évidence que les nanoparticules à base de Ch n'induisent pas d'effet inflammatoire, faisant de ces systèmes des candidats sécuritaires dont le potentiel thérapeutique mérite d'être pris en considération.

Partant des résultats de cette première partie du travail de doctorat, nous avons synthétisé des nanoparticules pour des applications spécifiques, en ciblant les macrophages. Le même modèle cellulaire a été utilisé pour la suite des travaux. Les applications ciblées sont l'induction de l'apoptose et l'inhibition du TNF- α (chapitre 6).

Deux polymères polycationiques ont été utilisés : le Ch et le PEI. Ces deux polymères ont été choisis pour leur potentiel de condensation d'ADN, mais aussi pour répondre à la question de l'efficacité de l'un par rapport à l'autre. De plus, l'utilisation du Ch s'inscrit comme une suite à notre précédent travail. Différents poids moléculaires (bas, moyen et haut) de chaque polymère ont été utilisés pour déterminer l'influence de ce paramètre sur l'efficacité de condensation des acides nucléiques et aussi son effet de point de vue cytotoxique.

Pour ce travail, le plasmide contenant le gène Bax- α (pORF-Bax- α) est utilisé pour la formation des nanoparticules avec chacun des polymères ayant différents poids moléculaires. Pour la détermination des conditions optimales, ils sont utilisés à différentes concentrations, lors de la synthèse des nanoparticules.

Le choix du gène Bax- α est basé sur son implication dans la régulation de l'apoptose. Ce rôle a été notamment mis en évidence en utilisant des oligonucléotides anti-sens pour inhiber son action, résultant ainsi dans l'inhibition de l'apoptose (Dibbert et al., 1999).

L'induction de l'apoptose chez les macrophages est basée sur le fait que les macrophages activés jouent un rôle important dans la pathogenèse de plusieurs maladies (voir chapitre 3), incluant les maladies auto-immunes. Ils représentent donc une bonne cible pour les médicaments immunosuppresseurs dont l'apoptose a été proposée comme étant l'un des mécanismes par lequel elles exercent leur effet. Ces médicaments sont souvent administrés pour inhiber l'inflammation et traiter les maladies rhumatoïdes, en partie parce qu'elles induisent l'apoptose des cellules immunitaires, dont les macrophages font partie (Green et Steinmetz, 2002 ; Choi et al., 2003).

Pour évaluer la capacité des nanoparticules à base de PEI et de Ch, produites après la complexation de chaque polymère avec le plasmide contenant le gène Bax- α , à induire l'apoptose des THP-1, nous avons d'abord procédé à la mesure de la viabilité cellulaire, suite au traitement des cellules avec les différentes nanoparticules. Le but de cette étape est de sélectionner les conditions optimales qui conduisent à la mortalité cellulaire, déterminée par le test MTT.

Dans un premier temps, les nanoparticules sont synthétisées en fixant la concentration d'ADN (1 μ g) et variant les concentrations des polymères, qui sont de 0.01, 0.02 et 0.05 % pour le Ch et de 0.225, 0.45 et 0.9 mg/mL pour le PEI. Des gels d'agarose, sur lesquels les différents échantillons ont été déposés, ont permis de montrer que les différentes conditions utilisées ont permis de complexer l'ADN de façon efficace (figure 6.1).

Par ailleurs, les résultats concernant la mortalité cellulaire ont permis de montrer que le Ch seul ou complexé avec le plasmide Bax- α n'a pas montré d'effet significatif sur la viabilité cellulaire; et cela quelque soit le poids moléculaire du polymère ou sa concentration (figure 6.2). Contrairement à ces résultats, le traitement des cellules avec le PEI de moyen (750 kDa) et haut poids moléculaire (1 000 kDa) a induit une mort cellulaire significative lorsqu'il est utilisé seul. Par contre, le PEI de bas poids moléculaire (25 kDa) a montré peu d'effet sur la mortalité cellulaire lorsqu'il est utilisé seul; effet qui a augmenté suite à sa complexation avec le plasmide renfermant le gène pro-apoptotique Bax- α , plus particulièrement lorsque la concentration du PEI est de 0.9 mg/mL (figure 6.3). Ces résultats sont en accord avec les travaux effectués par Godbey et ses collaborateurs (1999) qui ont montré que le PEI induit un effet cytotoxique considérable, lorsque son poids moléculaire excède les 25 kDa. Les résultats obtenus à cette étape ont alors permis d'éliminer le Ch et le PEI de moyen et haut poids moléculaire, pour la suite des études, le premier pour son inefficacité et le deuxième pour sa cytotoxicité.

La suite du travail a consisté alors à déterminer les conditions optimales de synthèse des nanoparticules à base de PEI de bas poids moléculaire, utilisé à la concentration de 0.9 mg/mL. Tout en fixant la concentration du PEI, la quantité d'ADN a été variée (1, 2.5 et 5 μ g/ 150 μ l de chlorure de sodium (NaCl) 150 mM). Les résultats montrés dans la figure 6.4 révèlent que la complexation du plasmide avec le PEI a un effet significatif sur l'induction de la mort cellulaire, mais que cet effet est indépendant de la concentration de l'ADN.

L'étape suivante de cette étude a consisté à déterminer si la mort cellulaire observée par le test MTT est vraiment de l'apoptose et si oui, quelle proportion des cellules en est affectée.

Dans un premier temps, la technique qui permet la détection de la fragmentation d'ADN a été utilisée mais les résultats ont montré que l'ADN cellulaire est resté intact (figure 6.5). Cependant, les plasmides ont demeuré intacts après la complexation avec le PEI (figure 6.5, ligne 5); ce qui n'est pas le cas lorsque l'ADN est utilisé seul comme contrôle (figure 6.5, ligne 4). Ces résultats attestent de l'efficacité du PEI à protéger l'ADN au niveau intracellulaire, après son internalisation par les macrophages.

Comme la fragmentation de l'ADN cellulaire figure parmi les étapes finales de l'apoptose, nous avons utilisé une autre technique qui permet de la détecter à des stades plus précoces (Schmid et al., 1994). Pour ce faire, le kit d'annexine V-phycoerythrin (PE) est utilisé pour le marquage des cellules après leur traitement avec les nanoparticules et les témoins positifs (formaldéhyde) et négatifs (cellules non traitées), ainsi que le PEI seul et l'ADN seul. Les nanoparticules sont formées en utilisant deux concentrations d'ADN (1 et 5 μ g). Les résultats sont révélés en utilisant la cytométrie en flux qui a révélé que l'apoptose induite en utilisant les nanoparticules produites suite à la complexation de 5 μ g d'ADN est deux fois plus élevée, en comparaison avec le témoin

négatif et le plasmide non complexé par le PEI. Cependant, le PEI seul a induit un haut niveau d'apoptose qui semble être réduite suite à la complexation avec l'ADN (figure 6.6). Des résultats similaires ont déjà été rapportés par Cherng et ses collaborateurs (1996) en utilisant le polymère poly ((2-diméthylamino) ethyl methacrylate) (PDMAEMA) pour la condensation de plasmides.

Étant donné le fait qu'un volume et une concentration constants de PEI ont été utilisés pour la complexation du plasmide Bax- α (1 μ g et 5 μ g dans le même volume), nous avons conclu que l'augmentation du taux de l'apoptose cellulaire induite en utilisant la plus haute concentration d'ADN (5 μ g) est due à l'efficacité des nanoparticules synthétisées dans ces conditions.

La suite du travail concernant l'application des nanoparticules à base de PEI, a consisté à complexer des oligodéoxynucléotides (ODN) anti-TNF- α pour inhiber la synthèse de la cytokine. Le choix de l'inhibition du TNF- α est basé sur des études qui ont mis en évidence l'implication de cette cytokine dans différentes pathologies (voir chapitre 3). Il a été démontré, dans un modèle de souris, qu'en bloquant la sécrétion du TNF- α , la maladie et/ou ses symptômes d'arthrite rhumatoïde étaient stoppés ou diminués (Piguet et al., 1992). En se basant sur les résultats d'essais cliniques, les inhibiteurs de TNF- α se révèlent être très prometteurs pour des utilisations visant les maladies inflammatoires. Un traitement, sous forme d'anticorps monoclonal chimérique (infliximab), visant à bloquer la sécrétion de cette cytokine, a montré une efficacité dans le traitement de la maladie inflammatoire de Crohn (Comerford et Bickston 2004). Ce produit a bénéficié, en 1998, de l'approbation par l'agence « food and drug administration », pour une utilisation dans le traitement de cas modérés à sévères de la maladie dont les patients ne répondaient pas aux traitements conventionnels. En 1999, la même agence a approuvé son usage pour le traitement de l'arthrite rhumatoïde dont le taux de rémission atteint les 30-40% après l'injection d'une seule dose (Maini et al., 1999).

Lors de notre travail, les THP-1 ont été stimulées avec 50 nM de LPS pendant 4 heures pour provoquer la sécrétion du TNF- α . Par la suite, les nanoparticules à base de PEI et d'ODN anti-TNF- α sont ajoutées. Les résultats ont montré que la sécrétion de la cytokine est inhibée de 15% après la complexation des ODNs avec le PEI. Par contre, cet effet n'a pas été observé lorsque les ODNs sont utilisés sous forme libre (figure 6.7), attestant de l'efficacité du PEI à protéger les ODNs et à potentialiser leur effet.

Une autre étude rapportée par Tschoep et al. (2001) a montré une inhibition du TNF- α de 62% en utilisant des ODNs anti-sens. Il faut cependant souligner que les cellules ont été stimulées par cinq fois moins de LPS et la technique utilisée est physique, permettant une entrée directe des ODNs dans le cytoplasme, évitant l'environnement acide de l'endosome. Une autre explication pour le pourcentage bas de l'inhibition du TNF- α dans nos études pourrait être du au manque de dissociation des ODNs du PEI.

En conclusion, ce travail a permis de mettre en évidence l'importance de l'évaluation des effets des nanoparticules sur les macrophages, que ce soit pour cibler ces cellules ou d'autres types cellulaires de l'organisme. C'est donc une étape qui devrait être nécessaire à effectuer lors du développement des systèmes nanoparticulaires.

Ce travail a aussi permis de ressortir le fait que les polymères biocompatibles, ne sont pas nécessairement, plus efficaces que ceux qui possèdent un certain niveau de toxicité. Nous avons démontré, en accord avec d'autres études, que plus le poids moléculaire des polymères utilisés pour véhiculer des acides nucléiques est élevé, plus leur toxicité peut augmenter.

Les résultats rapportés dans cette thèse sont prometteurs si l'on tient compte du fait que les macrophages sont des cellules très difficiles à transfecter, à cause de leur machinerie enzymatique. Il reste que les systèmes développés lors de notre travail ont besoin d'être améliorés pour obtenir des taux plus élevés d'efficacité, notamment pour l'inhibition des cytokines inflammatoires. En ce moment, l'utilisation des molécules qui interfèrent avec

l'ARN (siRNA), comme alternative aux ODNs anti-sens, connaît un engouement à cause de leur efficacité. Cependant, leurs effets ne sont pas encore connus étant donné le fait que leur utilisation est nouvelle dans le développement des nanoparticules.

Finalement, et compte tenu du potentiel thérapeutique que représente le ciblage des macrophages par les nanoparticules non virales, le travail abordé lors de cette thèse ouvre des perspectives intéressantes pour le traitement des maladies médiées par ces cellules. Il reste que le travail requis pour le développement d'un système non viral efficace nécessite encore des efforts dans les domaines de la chimie, pour la modification des propriétés des polymères, et de la biologie cellulaire et moléculaires qui permettront de comprendre les mécanismes d'action de ces systèmes et surtout de s'assurer de leur innocuité pour des utilisations *in vivo*.

ANNEXE 1



Mesenchymal stem cells, MG63 and HEK293 transfection using chitosan-DNA nanoparticles

Karin Corsi^{a,b}, Fatiha Chellat^{a,b}, L'Hocine Yahia^{a,b}, Julio C. Fernandes^{b,*}

^a Biomedical Engineering Institute, Biomechanics and Biomaterials Research Group, Ecole Polytechnique, P.O. Box 6079, Station Centre-Ville, Montreal, Que., Canada, H3C 3A7

^b Centre de recherche du CHUM-Hôpital Notre-Dame, Pavillon J.A. De Seve, 2nd Floor, Y-2605, 1560 Sherbrooke Est, Montreal, Que., Canada, H2L 4M1

Received 16 April 2002; accepted 3 October 2002

Abstract

Chitosan-DNA nanoparticles were synthesized from the complexation of the cationic polymer with a 6-kb DNA plasmid, in order to study the efficacy of chitosan to develop a non-viral gene delivery system that can be optimized for efficient gene therapy. The optimal binding conditions were determined with the fluorescamine and PicoGreen assays. DNA distribution within the nanoparticle was visualized by electron transmission microscopy, while the size and morphology were assessed by atomic force microscopy. The transfection potential was evaluated for the first time on human mesenchymal stem cells (MSCs), on human osteosarcoma cells (MG63) and on human embryonic kidney cells (HEK293). The LipofectAMINETM 2000 (LF) reagent was used in comparison. The effect of chitosan-DNA nanoparticles on cell viability was illustrated with the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. The nanoparticles formed are of a diameter inferior to 100 nm with a homogeneous distribution of DNA. The transfection of HEK293 cells is superior to that seen with MG63 cells and MSCs, however not surpassing that seen with LF. Minimal cytotoxicity is seen with the polyplexes compared to greater than 50% toxicity with LF. These results suggest that chitosan-DNA nanoparticles have favorable characteristics for non-viral gene delivery, are cell type dependent and not cytotoxic.

© 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: Chitosan; Cationic polymer; Nanoparticles; Non-viral gene delivery; Transfection; MSC

1. Introduction

Gene therapy involves the introduction of exogenous genes into target cells where production of the encoded protein will occur. In the case of acquired or inherited genetic disorders, this enables the replacement of a missing or defective gene, leading to normal cell function. Moreover, the introduction of DNA encoding antigenic proteins into cells has been studied for immunotherapy of cancer and viral infections [1,2]. It is also considered a promising approach for tissue engineering, especially in the field of orthopedics, where the delivered gene could be used as a short-term local

enhancer for repair of injured musculoskeletal tissue [3]. For example, genes encoding for growth factors implicated in bone formation, such as bone morphogenic proteins (BMPs), could be delivered to cells at a site necessitating bone healing. There they will be expressed as proteins and result in production of bone. This is an alternative to the direct delivery of tissue-inductive proteins, which is limited by low bioavailability, indications of toxicity and a short half-life, requiring repeated administrations [4].

DNA is delivered to cells either by the viral or non-viral system. Viral vectors include retroviruses, adenoviruses, adeno-associated viruses, herpes simplex virus and lentivirus [5]. Naked DNA, cationic liposomes, cationic lipids and polymers, as well as DNA/cationic liposome/polycation complexes are utilized in the non-viral approach [6–8]. Although viral systems have demonstrated high transfection efficiency when compared to non-viral vectors, they are accompanied by a

*Corresponding author. Tel.: +1-514-890-8000x25544, fax: +1-514-412-7583.

E-mail addresses: coriak@grhh.polymtl.ca (K. Corsi), fchellat@grhh.polymtl.ca (F. Chellat), yahia@grhh.polymtl.ca (L'Hocine Yahia), julio.fernandes@videotron.ca (J.C. Fernandes).

number of drawbacks that severely hinder their use in vivo [9]. Such limitations include their rapid clearance from the circulation, the reduced capacity to carry a large amount of genetic information and the associated risks of toxicity and immunogenicity, which limits the possibility of subsequent administrations. The advantage of the non-viral method resides in its being a safer alternative, demonstrating no immunogenicity, negligible toxicity, having the ability to carry large therapeutic genes and a reduced production cost [10]. For these reasons, there is an increased interest in the development of a safe and efficient non-viral gene delivery system that can circumvent the limitations seen with the viral approach.

Naked DNA, the simplest of the non-viral vectors, has demonstrated a transient gene expression following injection into muscular tissue [11]. However, its rapid degradation by nucleases in vivo has led to the investigation of a number of lipoplex and polyplex systems for non-viral gene delivery. The most commonly employed non-viral vectors are complexes composed of plasmid DNA and cationic lipids [12,13]. They are relatively large in size with positive charges that enhance their clearance from the circulation. Although they show an increased transfection efficacy in vitro, they have demonstrated toxicity both in vitro and in vivo [14,15]. On the other hand, polymers offer some specific advantages over liposomes. The efficiency with which cationic polymers bind and condense plasmid DNA permits the protection of the nucleic acids during the intracellular transport [16]. Furthermore, through their biodegradation, polymers can assure a controlled gene release which is a must for sustained protein expression. Another important aspect is the possibility to modify the polymer surface, raising the prospect of targeting specific cellular receptors. This specificity is essential to avoid side effects resulting from expression of the gene in sites other than those intended.

To achieve such versatility with a gene delivery system, various polymers have been studied, the first of which was poly(L-lysine) (pLL) [17]. Although it has been widely employed, it has demonstrated low transfection efficacy and evidence of cytotoxicity [4]. In the case of poly(ethylenimine), the level of transfection and cytotoxicity is closely related to the molecular weight of the polymer [18]. It has been shown that at a molecular weight above 25 kDa, it displays a high transfection efficiency, accompanied by cytotoxicity. At lower molecular weights, there is negligible transfection with little toxicity. The grafting of polyethylene glycol and a positively charged fusogenic peptide on the surface of the complex has recently managed to augment the transfection without an increase in cytotoxicity [19]. This demonstrates that modifying the polymer can lead to optimum results. In addition to the previously

mentioned polymers, others include poly(amidoamine), poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid) and chitosan, to name a few [4].

Chitosan is a natural cationic polysaccharide consisting of two subunits, D-glucosamine and N-acetyl-D-glucosamine linked together by $\beta(1,4)$ glycosidic bonds. It has been well defined with characteristics that include biocompatibility, low immunogenicity and minimal cytotoxicity [20,21]. Its promise as an efficient controlled drug release system has led to its use as a possible gene delivery system. In fact, current studies have shown that complexes composed of chitosan and DNA have a greater protection from degradation by nucleases and are raising much interest in the development of vaccines [22,23]. Currently, chitosan-based nasal vaccines are being tested in humans and demonstrate a lack of toxicity [23]. This polymer has also been shown to destabilize the lipid bilayer, thus facilitating its cellular uptake [24].

Chitosan-DNA complexes have been reported to transfect various cell types, namely human embryonic kidney cells (HEK293), human lung carcinoma cells (A549), B16 melanoma cells, COS-1 and HeLa cells [25–28]. To the best of our knowledge, there is no reference in the literature on the transfection of mesenchymal stem cells (MSCs) or osteoblasts using chitosan-DNA complexes, although the importance of such cells to diseases like osteoporosis make them potential candidates for future therapeutic approaches.

The aim of this study was to develop and characterize chitosan-DNA nanoparticles and to evaluate their transfection efficacy and their effect on cell viability on human osteosarcoma cells (MG63), MSCs and HEK293, compared to LipofectAMINE™ 2000 (LF), a commercially available lipid method.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Chitosan was purchased from Fluka Biochemica (Buchs, Switzerland) in molecular weights of 150, 400 and 600 kDa. The plasmid DNA VR1412 encoding the β -galactosidase reporter gene with a CMV promoter was obtained from VICAL Inc. (San Diego, CA, USA). QIAfilter plasmid Giga kit was obtained from Qiagen (Mississauga, ON, Canada). The PicoGreen reagent was purchased from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Trypsin-EDTA, penicillin-streptomycin (PS) mixture, RPMI-1640, phosphate buffered saline (PBS), agarose and LipofectAMINE™ 2000 reagent were obtained from Gibco-BRL (Burlington, ON, Canada). Fetal bovine serum (FBS) was acquired from Bio-Whittaker (Walkersville, USA). The β -gal ELISA kit was purchased from Roche Diagnostics Corporation

(Indianapolis, USA). Lysozyme was obtained from BioShop Canada (Burlington, ON, Canada). HAMF12/Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM/F12), minimum essential medium Eagle (MEM), sodium sulfate, sucrose, ethidium bromide, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), kanamycin, fluorescamine, chitosanase and other chemicals if not mentioned were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.2. Amplification and purification of plasmid DNA

The VR1412 plasmid DNA was purified using the Qiagen QIAfilter plasmid Giga kit according to the manufacturer's instructions and resuspended in water. The purity was confirmed with 0.8% agarose gel electrophoresis and DNA concentration was measured by UV absorption at 260 nm.

2.3. Chitosan/DNA complex synthesis

Chitosan of different molecular weights was dissolved with low heating (inferior to 45°C) in a 20 mM acetic acid solution at a pH of 5.5. The solution was then adjusted to final concentrations of 0.001–0.05% chitosan in 5 mM acetic acetate and passed through a 0.22 µm filter. The DNA used for synthesis was a solution of 200 µg DNA/ml of 4.3 mM sodium sulfate solution. Nanoparticles were prepared by a complex coacervation technique [27]. After heating the chitosan and DNA solutions to 55°C, 100 µl of the DNA solution was added to 100 µl of the chitosan solution and immediately vortexed at maximum speed for 1 min. The solution of nanoparticles produced was used for the transfection experiments without further modifications.

2.4. Complex formation and plasmid integrity following synthesis

Complex formation and the integrity of plasmid DNA following synthesis was evaluated by agarose gel electrophoresis. The chitosan-DNA nanoparticles were digested as previously described [27]. Briefly, 50 µl of nanoparticles were incubated for 4 h at 37°C with 40 µl of chitosanase (0.625 U/ml) and 10 µl of lysozyme (1000 U/ml) in a 50 mM NaAc-HOAc buffer at pH 5.5. Samples of naked DNA, undigested and digested nanoparticles were loaded onto a 0.8% agarose gel in Tris-borate EDTA buffer at pH 8.0. The samples were run on the gel at 80 V for 60 min, the gel stained with ethidium bromide (0.5 µg/ml) and photographed with the use of a MultiImageTM Light Cabinet (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, USA).

2.5. Fluorescamine assay

The degree of binding between chitosan and DNA was determined by the quantification of the free amino groups on chitosan before and after complexation with DNA by using the fluorescamine assay [29]. 10 µl of nanoparticle solution was added to 140 µl of 100 mM boric acid-NaOH, pH 8 in a 96-well plate. Wells containing only boric acid assay buffer were used to determine background fluorescence. 50 µl of a 0.01% fluorescamine solution prepared in acetone was added to each well, mixed, and incubated for 10 min at room temperature. The fluorescence was measured with a SpectraMax Gemini fluorometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) at an excitation wavelength of 390 nm and emission wavelength of 475 nm.

2.6. PicoGreen assay

Following synthesis, 100 µl nanoparticle mixture was added to 100 µl sucrose gradient of 55% (w/w) and centrifuged at 30,000 rpm for 10 min in an OptimaxTM Ultracentrifuge (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). Unbound DNA in the supernatant was determined with the PicoGreen assay according to the manufacturer's procedures. The fluorescence was measured with the SpectraMax Gemini fluorescence microplate reader at excitation and emission wavelengths of 480 and 520 nm, respectively.

2.7. Transmission electron microscopy

To determine the size and DNA distribution within the chitosan-DNA complexes, the particles were fixed overnight with a PBS solution containing 2.5% glutaraldehyde, followed by washings in 0.05 M cacodylate buffer supplemented with 3% sucrose. Samples were postfixed in 1.33% osmium tetroxide, dehydrated in graded ethanol, embedded in Epon and thin sectioned. After staining with uranyl acetate and counterstaining with lead citrate, samples were visualized with a Hitachi 7001 electron microscope at a 75 kV operation.

2.8. Atomic force microscopy (AFM) of chitosan-DNA complexes

The samples were prepared by placing 5 µl of the solution containing the chitosan-DNA complexes on a surface of freshly cleaved mica (Alfa Aesar, Ward Hill, MA, USA). After 5 min, to allow the complexes to bind, the excess liquid was removed by washing with ultrapure water and the mica was left to dry at room temperature under a laminar flow hood. All AFM observations were carried out with the aid of a Discover TMX2010 (Topometrix, Digital Instruments, CA, USA). The

imaging conditions used a Si_3N_4 pyramidal point in contact mode.

2.9. Cell culture

MG63 and HEK293 cells were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). The MG63 cells were grown in DMEM/F12 media. The HEK293 cells were grown in MEM. All media were supplemented with 10% FBS and 1% PS. Cells were cultured in a 5–95% CO_2 – O_2 atmosphere at 37°C.

MSCs were isolated from bone marrow obtained from the proximal femur of patients undergoing total hip replacement surgery. The isolation method used was modified from a previously reported technique [30]. Briefly, the marrow was diluted with PBS and subjected to a 70% Ficoll-Paque™ Plus gradient (Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Baie d'Urfé, QC, Canada). Cells collected at the interface were cultured in RPMI-1640 media supplemented with 10% FBS and 1% PS. The cells were grown in an incubator supplied with 5–95% CO_2 – O_2 at 37°C.

2.10. In vitro transfection studies

The cells were seeded, 24 h prior to transfection, on 24-well plates at a density of 50,000 cells/well in 1 ml of their usual culture medium supplemented with 10% FBS and 1% PS. The day of transfection, the culture medium was replaced with 500 μl of complete medium containing either naked DNA or chitosan-DNA nanoparticles and having an amount of DNA equivalent to 5 or 10 μg . Following an overnight incubation, the cells received 1 ml of complete medium and incubated until 60 h post-transfection. LF was used according to the manufacturer's procedures. Each well received 1 μl of LF that was complexed with 1 μg of DNA.

2.11. Determination of transfection efficiencies

For quantitative analysis of the β -gal expression, the β -gal ELISA kit was used according to the manufacturer's instructions. Briefly, the cells were lysed 60 h after transfection with the lysis buffer included in the kit and the cell extracts were centrifuged at maximum speed for 15 min at 4°C to remove any debris. The supernatant was then used for the ELISA. β -galactosidase expression was determined as picogram β -gal per milligram of cellular protein. Total protein content of the samples was measured using the BCA protein assay (Pierce, Rockford, Illinois, USA).

2.12. Cell viability

Cytotoxicity studies were performed 60 h after transfection. HEK293, MG63 and MSC received 1 ml culture

medium per well containing 100 μl of a 5 mg/ml MTT solution. Following a 4 h incubation at 37°C, the MTT containing medium was replaced with 200 μl of isopropanol-HCl (0.1N) and kept at 37°C for 10 min to solubilize the formazan crystals. The samples were transferred to 96-well plates and the absorbance of the converted dye was measured at 570 nm. The percent cell viability of the control (non treated) cells was taken as 100%.

2.13. Statistical analysis

All measurements were collected in triplicate and experiments repeated three times. Values are expressed as mean \pm standard error of mean (SEM). Statistical testing was carried out using the one way ANOVA test with $P < 0.05$ considered as a statistically significant difference.

3. Results and discussion

In the present study, we evaluated the efficacy of chitosan as a non-viral gene delivery system that can be optimized for efficient gene therapy. The synthesis of chitosan-DNA complexes was facilitated by the attraction between the free amino groups on the polymer and the negatively charged phosphates found on the DNA. The formed complexes were characterized and evaluated for the first time on osteoblast-like cells and MSC.

3.1. Characterization of chitosan-DNA complexes

In order to determine the optimal synthesis conditions, it was necessary to evaluate the degree of binding between chitosan and DNA at different molecular weights and chitosan concentrations. This was done using the fluorescamine and PicoGreen assays as complementary techniques, which, respectively, measure the free amino groups on the polymer and the unbound DNA in the supernatant. The fluorescamine assay has been previously employed to monitor the interaction between DNA and poly(L-lysine) [29]. This technique is very important as it does not interact with amino groups once they have bound to DNA. Thus, it permitted the quantification of the free amino groups on chitosan, before and after addition of DNA. This is illustrated in Fig. 1a, where as expected, an increase in chitosan concentration results in an increase in free amino groups. However, following the addition of DNA, there is a decrease in the availability of amino groups, confirming the interaction between the latter and the negative phosphate groups found on DNA (Fig. 1b). The remaining free amino groups after addition of DNA implicates that the synthesis conditions occur in an excess of chitosan, which should encourage the

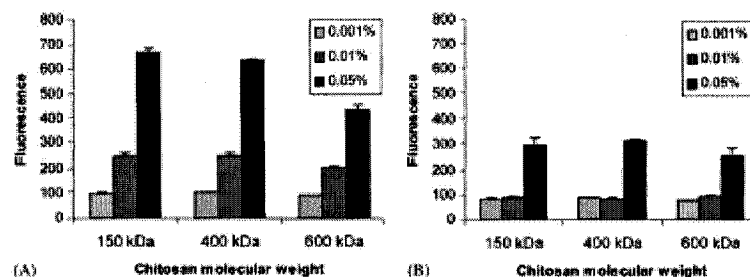


Fig. 1. Free amine groups on chitosan before (A) and after (B) addition of DNA. Chitosan molecular weights of 150, 400 and 600 kDa at concentrations 0.001%, 0.01% and 0.05% were used.

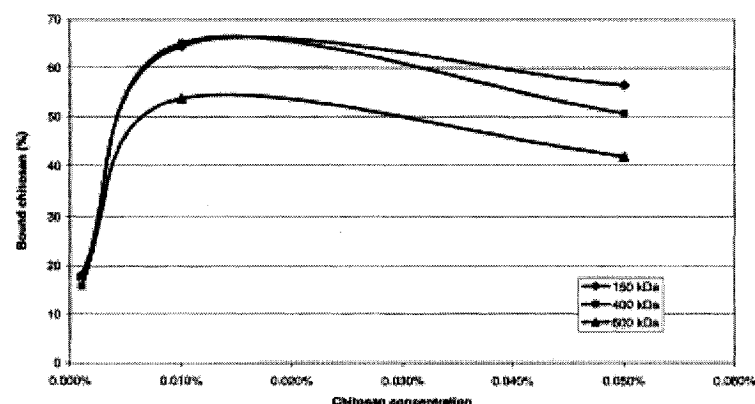


Fig. 2. Effect of chitosan molecular weight and concentration on percentage of bound chitosan.

interaction with the DNA. The decrease observed also allowed us to determine the percentage of bound chitosan, hence permitting identification of the ideal synthesis conditions. As demonstrated in Fig. 2, the optimal binding efficacy for all molecular weights was at a chitosan concentration between 0.01% and 0.02%. The effective binding between chitosan and DNA is further confirmed with the PicoGreen assay, a fluorescent nucleic acid stain. After synthesis, the mixture containing the nanoparticles was ultracentrifuged and the unbound DNA found in the supernatant was quantified by this technique. This is an indicator of the amount of DNA that interacted with the polymer. The results are shown in Fig. 3, where regardless of the molecular weight and concentration of chitosan, the percentage of bound DNA approaches 100%. Both these techniques are complementary and supply evidence of binding between the positive amino groups of the chitosan and the negative phosphate groups of the DNA.

Although condensation of the DNA by the chitosan is of great importance, the plasmid DNA must remain

intact to assure its functionality once inside the cell. A widely used method to monitor the DNA condensation and the effect of such conditions on the integrity of the plasmid DNA is that of gel electrophoresis. Chitosan at a concentration of 0.02% was used for synthesis of the complexes viewed in Fig. 4. The intact DNA, before synthesis, is seen in lane 2, while complexes of chitosan-DNA of molecular weights 150, 400 and 600 kDa were loaded in lanes 3, 5 and 7, respectively. The DNA in these three lanes is unable to migrate and remains in the gel loading wells, indicating a strong attachment of the DNA to the chitosan. Furthermore, no unbound DNA is seen in these lanes, confirming the results obtained with the PicoGreen. Following digestion with chitosanase and lysozyme, the plasmid DNA was released from the chitosan and could be viewed in lanes 4, 6, and 8. As previously reported, the plasmid is intact and shows no signs of degradation [27]. This suggests that the synthesis conditions utilized did not affect the integrity of the condensed DNA.

In order to assess the size and morphology of the chitosan-DNA nanoparticles, microscopy techniques

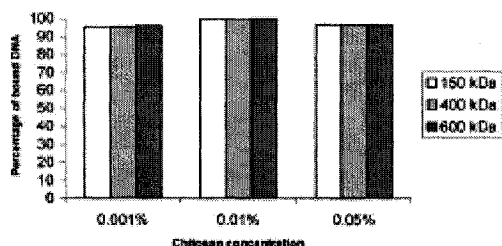


Fig. 3. Percentage of bound DNA as determined with the PicoGreen assay, which quantifies unbound DNA.

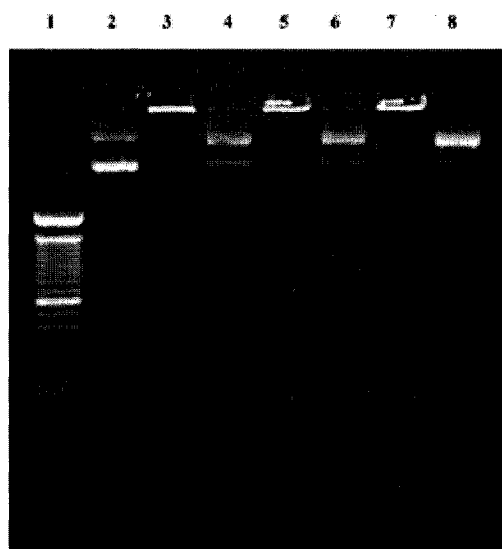


Fig. 4. Electrophoresis of chitosan-DNA nanoparticles to determine plasmid integrity following synthesis. Nanoparticles were digested with chitosanase and lysozyme after synthesis and the released DNA was visualized with ethidium bromide. Lane 1: Molecular weight marker; lane 2: VR1412 plasmid DNA; lane 3: nanoparticles composed of 150 kDa chitosan; lane 4: lane 3 + digestion; lane 5: nanoparticles composed of 400 kDa chitosan; lane 6: lane 5 + digestion; lane 7: nanoparticles composed of 600 kDa chitosan; lane 8: lane 7 + digestion.

were employed. Electron microscopy allowed the visualization of the DNA within the chitosan-DNA complexes. The nanoparticles were embedded, sectioned and the DNA stained with uranyl acetate and lead citrate, giving it a darker appearance. Fig. 5 demonstrates a homogenous distribution of DNA within the particles. On the other hand, atomic force microscopy revealed the size and morphology of the synthesized particles. The complexes appear spherical with a mean size that is inferior to 100 nm as can be seen in Fig. 6.

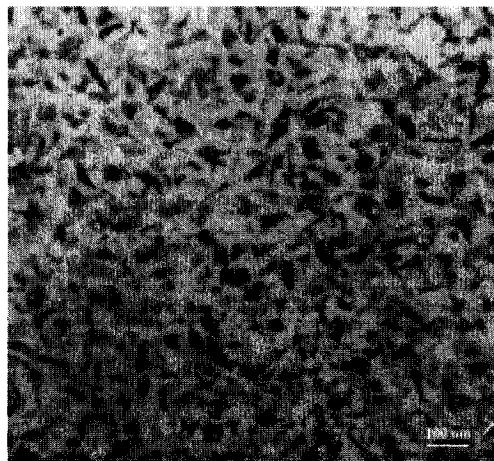


Fig. 5. Transmission electron microscopy of chitosan-DNA nanoparticles. Homogenous distribution of DNA is seen following staining with uranyl acetate and lead citrate. Bar = 100 nm.

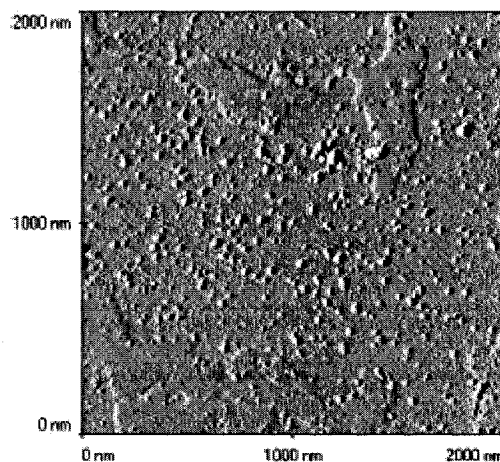


Fig. 6. Atomic force microscopy analysis of complexes formed between chitosan and DNA.

This size is in accordance with previously published results on the use of chitosan to complex DNA. Illum et al. have synthesized chitosan-DNA nanoparticles ranging from 20–500 nm [23]. Furthermore, our complexes are smaller than other polymeric systems, which range from 100 to 750 nm [25,31,32]. The importance of size is inevitable for a favorable cellular uptake. It has been reported that polycation-DNA gene delivery systems mostly enter the cell by endocytosis or pinocytosis, having a size requirement inferior to

100 nm [33]. Although it has been shown that endocytosis is not the likely route for the chitosan-DNA nanoparticles, there is a possibility that their uptake may occur by pinocytosis [27]. Hence, the chitosan-DNA nanoparticles produced by complex coacervation have the required size to facilitate their uptake by mammalian cells.

3.2. Transfection efficiency *in vitro*

In addition to condensing the plasmid DNA, an efficient gene delivery system is required to transport the gene into the cell and see to its eventual release, leading to gene expression and subsequent protein synthesis. It is thus necessary to test a gene carrier on different cell lines, especially cells that resemble those that will be targeted. The current study aimed to determine the ability of chitosan-DNA nanoparticles to transfer the β -gal gene *in vitro* to cells implicated in bone and joint applications. As such, the polyplexes were incubated with MG63 cells, which have characteristics resembling those of osteoblasts and with MSCs, which are implicated in the formation of tissues such as cartilage, bone, tendons, and muscle [34]. The transfection occurred in serum medium to more closely mimic conditions found *in vivo* and the transfection efficacy compared to a lipoplex technique. The transfection of HEK293 cells is shown in Fig. 7a. They have previously been transfected by a chitosan-DNA complex [27]. Thus, they served as a positive control, demonstrating that the nanoparticles synthesized in this study entered the cell and led to the synthesis of the β -galactosidase protein. Moreover, the nanoparticles composed of chitosan of molecular weight 400 kDa and a DNA quantity equivalent to 10 μ g resulted in a transfection that was statistically significant compared to the cells having received solely DNA. MG63 cells do not demonstrate the same level of transfection (Fig. 7b). This can possibly be explained by a delayed internalization of the nanoparticles when compared to the HEK293 cells. In fact, fluorescent microscopy observations undertaken by our group on nanoparticles incubated with human osteoblasts indicate that the particles remain bound to the surface for as long as one week following incubation (F. Chellat et al., unpublished data). However, MSCs did demonstrate gene expression when transfected with chitosan-DNA nanoparticles. This was clearly seen by a number of cells turning blue following X-gal staining (not shown), yet their transfection efficacy is not statistically significant when compared to cells receiving solely naked DNA. All three cell types showed transfection rates inferior to that seen with the LF technique.

Seeing the current non-specificity of the polymer-based gene delivery system employed in this study, it is comprehensible that such variations among different cell

types occur. Erbacher et al. have already reported such cell type dependence of chitosan-DNA complexes [35]. Cellular membrane composition varies among cellular types and may facilitate or hinder the binding of the nanoparticles and subsequent internalization. This has been shown to be important with the complexes of cationic lipid and DNA [36]. Cells that were deficient in proteoglycan synthesis were more difficult to transfect, suggesting a possible role of this molecule for successful internalization of the gene carrier. Thus, knowledge of the composition of the cellular membrane along with the receptors that distinguish it from other cells, will allow specific cell targeting. This can be accomplished by modifying the surface of the nanoparticles to facilitate its interaction with the cell of interest, a task that has been undertaken by other groups [7,37]. However, no such modifications have been reported to be directed towards optimizing the transfection of osteoblastic or human mesenchymal stem cells. Current studies by our group aim towards this goal.

The study of osteoblasts and MSCs for tissue engineering is of great importance since expression of growth factors by these cells has already been shown to lead to bone formation. In one instance, MSCs were transfected by an adenovirus carrying the gene for BMP-2 and then seeded on a demineralized bone matrix. Implantation of this matrix into surgically produced gaps in the leg bone of rats led to a complete healing [38]. Although successful outcomes have resulted with the viral gene delivery system, concerns regarding such an approach still remain and encourage research towards alternative methods. Such a path was taken by Bonadio et al. who obtained similar results with the non-viral approach [3]. Matrices were loaded with plasmids containing a human parathyroid hormone gene, aiming at the repair of bone. Implantation of this loaded matrix into surgical gaps in the long bones of dogs resulted in a complete healing of the injured bone.

3.3. Cell viability

For eventual applicability *in vivo*, a required characteristic of gene delivery systems is that of absent cytotoxicity. The effect of the chitosan-DNA nanoparticles on cell viability was determined with the MTT assay. As illustrated in Fig. 8a, HEK293 cells approach the viability seen with the control when incubated with 5 μ g of naked DNA. There is a slight decrease in viability when the cells are in contact with either 10 μ g of naked DNA or nanoparticles containing an amount of DNA that is equivalent to 10 μ g. MG63 cells demonstrate no reduced cell viability following their incubation with the nanoparticles. MSC also do not seem to be affected from their incubation with nanoparticles. These results suggest a relation between the amount of transfection and observed cytotoxicity.

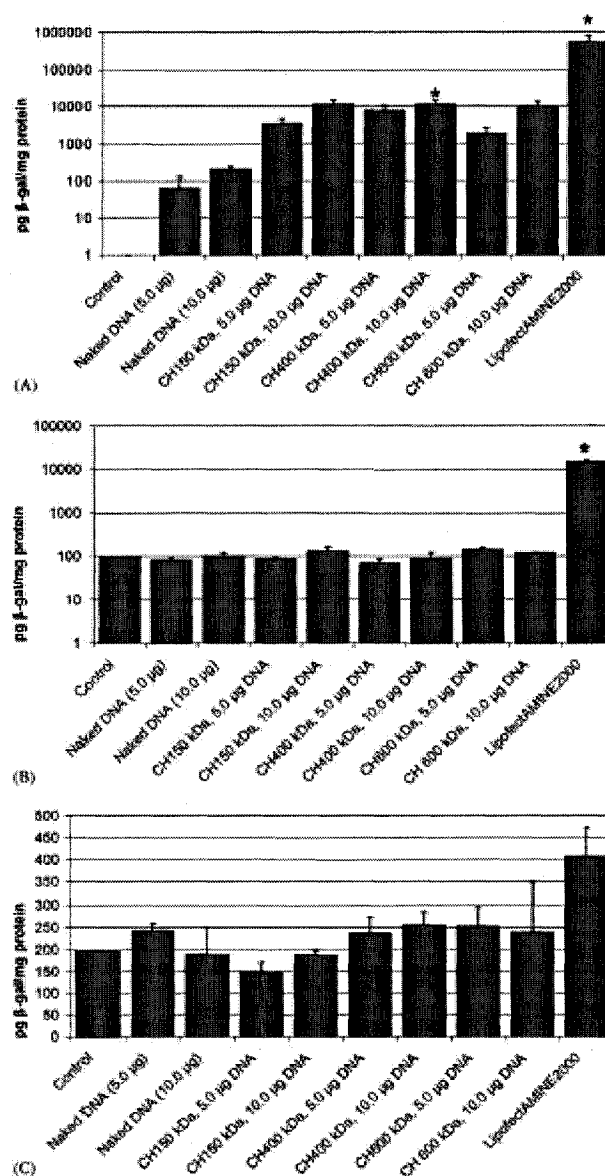


Fig. 7. Transfection efficiency of chitosan-DNA nanoparticles incubated with (A) HEK293 cells, (B) MG63 cells and (C) MSCs in the presence of 10% serum. Cells received either 5.0 or 10.0 μg of naked DNA or nanoparticles composed of different molecular weights of 0.02% chitosan containing 5.0 or 10.0 μg of DNA.

The nanoparticles containing 10 μg of DNA affect cell viability in HEK yet increase the transfection efficacy, while conditions that did not result in gene expression, show no toxicity. However, compared to the LF

technique, which reduced cellular viability up to 40%, the chitosan-DNA nanoparticles demonstrate negligible and at times absent cytotoxicity. These results are in accordance with toxicity studies done on other cell types

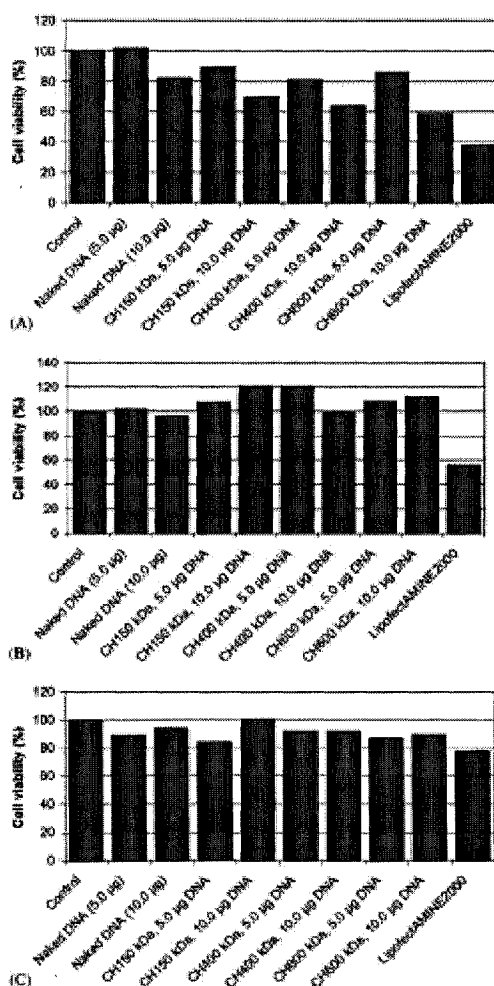


Fig. 8. Biocompatibility of chitosan-DNA nanoparticles illustrated by lack of cellular toxicity on (A) HEK293 cells, (B) MG63 cells and (C) MSCs incubated with either 5.0 or 10.0 µg of naked DNA, or with nanoparticles composed of different molecular weights (150, 400 and 600 kDa) containing an equivalent to 5.0 or 10.0 µg of DNA. LipofectAMINE™ 2000 reagent was used in comparison. Cell viability is measured with the MTT assay and compared to non-treated cells, which are considered as 100%.

exposed to chitosan-DNA complexes. Sato et al. showed optimal cell viability of A549 cells following incubation with the polyplexes and believes that the low toxicity allows a larger dose to be administered, resulting in a higher transfection efficiency [28]. The same lack of toxicity with chitosan and trimethylated chitosan oligomers on COS-1 and Caco-2 cells has also been demonstrated [39].

4. Conclusion

As stated earlier, gene therapy offers a promising approach for the treatment of genetic disorders, vaccine development and tissue engineering. However, such opportunities will only be realized by the development of a safe and efficient gene delivery system. This system must protect the DNA, allow it to enter the targeted cell and reach the nucleus where genetic expression will take place. In the present study, we established the optimal synthesis conditions for the complexation of chitosan to DNA to form nanoparticles. The complexes were of a mean diameter inferior to 100 nm with the interior of the particles showing homogenous DNA distribution. The efficacy of transfection in vitro on HEK293, MG63 and MSC demonstrated cell type dependence, with HEK293 cells having a higher gene expression. Cell viability studies following incubation with the nanoparticles confirmed the lack of toxicity of chitosan. The ability of this gene carrier to transfect cells implicated in the formation of musculoskeletal tissues raises the prospect of optimizing this system to deliver genetic information that will lead to optimal healing and regeneration of such tissues. Such modifications lie in the ability to target specific cells and to control the release of the plasmid DNA. Current investigations by our group focus on these issues; namely on surface modifications and an in vitro DNA release study of chitosan-DNA nanoparticles in simulated physiological media. Therefore, chitosan-DNA nanoparticles, by their reduced cytotoxicity and ability to transport and release genes intracellularly, where expression of the encoded protein occurs, are considered as a potential candidate for a non-viral gene carrier.

Acknowledgements

We would like to thank Dr. Peter Hobart from VICAL Inc. for kindly providing the VR1412 plasmid. This work was supported in part by grants from the Fonds pour la Formation des Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR), Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ), Department of Surgery of the University of Montreal and Stryker-Howmedica Osteonics Canada Inc.

References

- [1] Vile RG, Russell SJ, Lemoine NR. Cancer gene therapy: hard lessons and new courses. *Gene Ther* 2000;7:2-8.
- [2] Okuda K, Ihata A, Watabe S, Okada E, Yamakawa T, Hamajima K, Yang J, Ishii N, Nakazawa M, Okuda K, Ohnari K, Nakajima K, Xin KQ. Protective immunity against influenza A virus induced by immunization with DNA plasmid containing influenza M gene. *Vaccine* 2001;19:3681-91.

- [3] Bonadio J, Smiley E, Patel P, Goldstein S. Localized, direct plasmid gene delivery in vivo: prolonged therapy results in reproducible tissue regeneration. *Nat Med* 1999;5:753-9.
- [4] Han S, Mahato RI, Sung YK, Kim SW. Development of biomaterials for gene therapy. *Mol Ther* 2000;2:302-17.
- [5] Oligino TJ, Yao Q, Ghivizzani SC, Robbins P. Vector systems for gene transfer to joints. *Clin Orthop* 2000;(379 Suppl): S17-30.
- [6] Zephati O, Nguyen C, Ferrari M, Felgner J, Tsai Y, Felgner PL. Stable and monodisperse lipoplex formulations for gene delivery. *Gene Ther* 1998;5:1272-82.
- [7] Park IK, Kim TH, Park YH, Shin BA, Choi ES, Chowdhury EH, Akaike T, Cho CS. Galactosylated chitosan-graft-poly(ethylene glycol) as hepatocyte-targeting DNA carrier. *J Control Rel* 2001;76:349-62.
- [8] Gao X, Huang L. Potentiation of cationic liposome-mediated gene delivery by polycations. *Biochemistry* 1996;35:1027-36.
- [9] Luo D, Salzman WM. Synthetic DNA delivery systems. *Nat Biotechnol* 2000;18:33-7.
- [10] Romano G, Michell P, Pacilio C, Giordano A. Latest developments in gene transfer technology: achievements, perspectives, and controversies over therapeutic applications. *Stem Cells* 2000;18:19-39.
- [11] Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 1990;247:1465-8.
- [12] Monck MA, Mori A, Lee D, Tam P, Wheeler JJ, Cullis PR, Scherrer P. Stabilized plasmid-lipid particles: pharmacokinetics and plasmid delivery to distal tumors following intravenous injection. *J Drug Target* 2000;7:439-52.
- [13] Maurer N, Mori A, Palmer L, Monck MA, Mak KW, Mui B, Akhong QF, Cullis PR. Lipid-based systems for the intracellular delivery of genetic drugs. *Mol Membr Biol* 1999;16:129-40.
- [14] Li S, Huang L. In vivo gene transfer via intravenous administration of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes. *Gene Ther* 1997;4:891-900.
- [15] Brown MD, Schatzkin AG, Uchegbu IF. Gene delivery with synthetic (non-viral) carriers. *Int J Pharm* 2001;229:1-21.
- [16] Dunlap DD, Maggi A, Soria MR, Monaco L. Nanoscopic structure of DNA condensed for gene delivery. *Nucl Acids Res* 1997;25:3095-101.
- [17] Wu GY, Wu CH. Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system. *J Biol Chem* 1987;262:4429-32.
- [18] Godbey WT, Wu KK, Mikos AG. Size matters: molecular weight affects the efficiency of poly(ethylenimine) as a gene delivery vehicle. *J Biomed Mater Res* 1999;45:268-75.
- [19] Lee H, Jeong JH, Park TG. PEG grafted polylysine with fusogenic peptide for gene delivery: high transfection efficiency with low cytotoxicity. *J Control Rel* 2002;79:283-91.
- [20] Rao SB, Sharma CP. Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential. *J Biomed Mater Res* 1997;34: 21-8.
- [21] Richardson SC, Kolbe HV, Duncan R. Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA. *Int J Pharm* 1999;178:231-43.
- [22] Cui Z, Munger RJ. Chitosan-based nanoparticles for topical genetic immunization. *J Control Rel* 2001;75:409-19.
- [23] Illum L, Jahraat-Gill I, Hinchcliffe M, Fisher AN, Davis SS. Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;51:81-96.
- [24] Fang N, Chan V, Mao HQ, Leong KW. Interactions of phospholipid bilayer with chitosan: effect of molecular weight and pH. *Biomacromolecules* 2001;2:1161-8.
- [25] MacLaughlin FC, Munger RJ, Wang J, Tagliaferri JM, Gill I, Hinchcliffe M, Rolland AP. Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery. *J Control Rel* 1998;56:259-72.
- [26] Ishii T, Okahata Y, Sato T. Mechanism of cell transfection with plasmid/chitosan complexes. *Biochim Biophys Acta* 2001;1514: 51-64.
- [27] Mao HQ, Roy K, Truong-Le VL, Janes KA, Lin KY, Wang Y, August JT, Leong KW. Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. *J Control Release* 2001;70:399-421.
- [28] Sato T, Ishii T, Okahata Y. In vitro gene delivery mediated by chitosan. Effect of pH, serum, and molecular mass of chitosan on the transfection efficiency. *Biomaterials* 2001;22:2075-80.
- [29] Read ML, Erych T, Ulbrich K, Seymour LW. Characterisation of the binding interaction between poly(L-lysine) and DNA using the fluorescamine assay in the preparation of non-viral gene delivery vectors. *FEBS Lett* 1999;461:96-100.
- [30] Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AL. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* 1992;13:81-8.
- [31] Leong KW, Mao HQ, Truong-Le VL, Roy K, Wakh SM, August JT. DNA-polycation nanospheres as non-viral gene delivery vehicles. *J Control Rel* 1998;53:183-93.
- [32] Truong-Le VL, August JT, Leong KW. Controlled gene delivery by DNA-gelatin nanospheres. *Hum Gene Ther* 1998;9: 1709-17.
- [33] Wolfert MA, Seymour LW. Atomic force microscopic analysis of the influence of the molecular weight of poly(L-lysine) on the size of polyelectrolyte complexes formed with DNA. *Gene Ther* 1996;3:269-73.
- [34] Caplan AL. Mesenchymal stem cells and gene therapy. *Clin Orthop* 2000;(379 Suppl):S67-70.
- [35] Erbacher P, Zou S, Bettinger T, Steffan AM, Remy JS. Chitosan-based vector/DNA complexes for gene delivery: biophysical characteristics and transfection ability. *Pharm Res* 1998;15: 1332-9.
- [36] Pouton CW, Lucas P, Thomas BJ, Uchichi AN, Milroy DA, Moss SJ. Polycation-DNA complexes for gene delivery: a comparison of the biopharmaceutical properties of cationic polypeptides and cationic lipids. *J Control Rel* 1998;53:289-99.
- [37] Nah JW, Yu L, Han S, Ahn CH, Kim SW. Artery wall binding peptide-poly(ethylene glycol)-grafted-poly(L-lysine)-based gene delivery to artery wall cells. *J Control Rel* 2002;78:273-84.
- [38] Lieberman JR, Duhaiski A, Stevenson S, Wu L, McAllister P, Lee YP, Kubo JM, Finerman GA, Berk AJ, Witte ON. The effect of regional gene therapy with bone morphogenetic protein-2-producing bone-marrow cells on the repair of segmental femoral defects in rats. *J Bone J Surg Am* 1999;81:905-17.
- [39] Thanou M, Florea BI, Giddof M, Junginger HE, Borchard G. Quaternized chitosan oligomers as novel gene delivery vectors in epithelial cell lines. *Biomaterials* 2002;23:153-9.

RÉFÉRENCES

ABUCHOWSKI, A., VAN ES, T., PALCZUK, N.C., DAVIS, F.F. (1977). Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol. *J. Biol. Chem.*, **252**, 3578-3581.

ALEXANDER, H.E., KOCH G., MOUNTAIN I.M., SPRUNT K., VAN DAMME O. (1958). Infectivity of ribonucleic acid of poliovirus on HeLa cell monolayers. *J. Exp. Med.*, **108**, 493-506.

ALLINQUANT, B., HANTRAYE, P., MAILLEUX, P., MOYA, K., BOUILLOT, C., PROCHIANTZ, A. (1995). Downregulation of amyloid precursor protein inhibits neurite outgrowth in vitro. *Cell Biol*, **128**, 919-927.

ALMOG, R., FORWARD, R., SAMSONOFF, C. (1991). Stability of sonicated aqueous suspensions of phospholipids under air. *Chem. Phys. Lipids*, **60**, 93-99.

ANSON, D.S., HOCK R.A., AUSTEN D., SMITH K.J., BROWNLEE G.G., VERMA I.M., MILLER A.D. (1987). Towards gene therapy for hemophilia B. *Mol. Biol. Med.*, **4**, 11-20.

ASOKAN, A., CHO, M.J. (2002). Exploitation of intracellular pH gradients in the cellular delivery of macromolecules. *J. Pharm. Sci.*, **91**, 903-13.

ATZENI, F., SARZI-PUTTINI, P., DORIA, A., IACCARINO, L., CAPSONI, F. (2005). Potential off-label use of infliximab in autoimmune and non-autoimmune diseases: a review. *Autoimmun Rev.*, **4**, 144-152.

BAATZ, J.E., BRUNO, M.D., CIRAOLLO, P.J., GLASSER, S.W., STRIPP, B.R., SMYTH, K.L., KORFHAGEN, T.R. (1994). Utilization of modified surfactant-associated protein B for delivery of DNA to airway cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **91**, 2547-2551.

BALICKI, D., PUTNAM, C.D., SCARIA, P.V., BEUTLER, E. (2002). Structure and function correlation in histone H2A peptide-mediated gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **99**, 7467-7471.

BARENHOLZ, Y., GIBBES, D., LITMAN, B.J., GOLL, J., THOMPSON, T.E., CARLSON, R.D. (1977). A simple method for the preparation of homogeneous phospholipid vesicles. *Biochemistry*, **16**, 2806-2810.

BASHFORD, C.L., ALDER, G.M., MENESTRINA, G., MICKLEM, K.J., MURPHY J.J., PASTERNAK C.A. (1986). Membrane damage by hemolytic viruses, toxins, complement, and other cytotoxic agents. A common mechanism blocked by divalent cations. *J Biol Chem.*, **261**, 9300-9308.

BATRA, R.K., WANG-JOHANNING, F., WAGNER, E., GARVER, R.I. JR, CURIEL, D.T. (1994). Receptor-mediated gene delivery employing lectin-binding specificity. *Gene Ther.*, **1**, 255-260.

BAZILE, D., PRUD'HOMME, C., BASSOULLET, M.T., MARLARD, M., SPENLEHAUER, G., VEILLARD, M. (1995). Stealth Me.PEG-PLA nanoparticles avoid uptake by the mononuclear phagocytes system. *J. Pharm. Sci.*, **84**, 493-498.

BEHR, J.P. (1986). DNA strongly binds to micelles and vesicles containing lipopolyamines or lipointercalants. *Tetrahedron Lett.*, **27**, 5861-5864.

BERTON, M., TURELLI, P., TRONO, D., STEIN, C.A., ALLEMANN, E., GURNY, R. (2001). Inhibition of HIV-1 in cell culture by oligonucleotide-loaded nanoparticles. *Pharm. Res.*, **18**, 1096-1101.

BINGLE, L., BROWN, N. J., LEWIS, C. E. (2002). The role of tumor-associated macrophages in the growth and metastasis of malignant human tumors. *J. Pathol.*, **196**, 254-265.

BLOOMFIELD, V.A. (1996). DNA condensation. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **6**, 334-341.

BOUSSIF, O., LEZOUALCH, F., ZANTA, M.A., MERGNY, M.D., SCHERMAN, D., DEMENEIX, B., BEHR, J.P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 7297-7301.

BROWNLIE, A., UCHEGBU, I.F., SCHATZLEIN, A.G. (2004). PEI-based vesicle-polymer hybrid gene delivery system with improved biocompatibility. *Int. J. Pharm.*, **274**, 41-52.

BUSCHLE, M., COTTON, M., KIRLAPPOS, H., MECHTLER, K., SCHAFFNER, G., ZAUNER, W., BIRNSTIEL, M.L., WAGNER, E. (1995). Receptor-mediated gene transfer into human T lymphocytes via binding of DNA/CD3 antibody particles to the CD3 T cell receptor complex. *Hum. Gene Ther.*, **6**, 753-761.

CABRAL, D.A., LOH, B.A., SPEERT, D.P. (1987). Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* resists nonopsonic phagocytosis by human neutrophils and macrophages. *Pediatr Res.*, **22**, 429-431.

CAPECCHI, M.R. (1980). High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell.*, **22**, 479-488.

CATALDO, D., MUNAUT, C., NOEL, A., FRANKENNE, F., BARTSCH, P., FOIDART, J. M., LOUIS R. (2001). Matrix metalloproteinases and TIMP-1 production by peripheral blood granulocytes from COPD patients and asthmatics. *Allergy*, **56**, 145-151.

CECH, T.R., ZAUG, A.J., GRABOWSKI, P.J. (1981). *In vitro* splicing of the ribosomal RNA precursor of Tetrahymena: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. *Cell*, **27**, 487-496.

CHAN, C.K., JANS, D.A. (1999). Enhancement of polylysine-mediated transferrin infection by nuclear localization sequences: polylysine does not function as a nuclear localization sequence. *Hum. Gene Ther.*, **10**, 1695-1702.

CHEN, D.J., MAJORS, B.S., ZELIKIN, A., PUTNAM, D. (2005). Structure-function relationships of gene delivery vectors in a limited polycation library. *J. Control. Release*, **103**, 273-283.

CHEN, J., GAMOU, S., TAKAYANAGI, A., SHIMIZU, N. (1994). A novel gene delivery system using EGF receptor-mediated endocytosis. *FEBS Lett.*, **338**, 167-169.

CHERNG, J.Y., VAN DE WETERING, P., TALSMA, H., CROMMELIN, D.J., HENNINK, W.E. (1996). Effect of size and serum proteins on transfection efficiency of poly ((2-dimethylamino)ethyl methacrylate)-plasmid nanoparticles. *Pharm. Res.*, **13**, 1038-1042.

CHEUNG, C.Y., MURTHY, N., STAYTON, P.S., HOFFMAN, A.S. (2001). A pH-sensitive polymer that enhances cationic lipid-mediated gene transfer. *Bioconjug Chem* **12**, 906-910.

CHEUNG, C.Y., STAYTON, P.S., HOFFMAN, A.S., (2005). Poly(propylacrylic acid)-mediated serum stabilization of cationic lipoplexes. *J Biomater Sci Polym Ed.*, **16**, 163-179.

CHO, T.-J., LEHMANN, W., EDGAR, C., SADEGHI, C., HOU, A., EINHORN, T.A., GERSTENFELD, L.C. (2003). Tumor necrosis factor- α activation of the apoptotic cascade in murine articular chondrocytes is associated with the induction of metalloproteinases and specific pro-resorptive factors. *Arthritis Rheum.*, **48**, 2845-2854.

CHOI, Y.J., KIM, T.G., KIM, Y.H., LEE, S.H., KWON, Y.K. SUH, S.I., PARK, J.W., KWON, T.K. (2003). Immunosuppressant PG490 (triptolide) induces apoptosis through the activation of caspase-3 and down-regulation of XIAP in U937 cells, *Biochem. Pharmacol.* **66**, 273-280.

CHOKSAKULNIMITR, S., MASUDA, S., TOKUDA, H., TAKAKURA, Y. (1995). In vitro cytotoxicity of macromolecules in different cell culture systems. *J. Control. Release*, **34**, 233-241.

CIFTCI, K., LEVY, R.J. (2001). Enhanced plasmid DNA transfection with lysosomotropic agents in cultured fibroblasts. *Int. J. Pharm.*, **218**, 81-92.

CLAUSS, M., SUNDERKOTTER, C., SVEINBJORNSSON, B., HIPPENSTIEL, S., WILLUWEIT, A., MARINO, M., HAAS, E., SELJELID, R., SCHEURICH, P., SUTTORP, N., GRELL, M., RISAU, W. (2001). A permissive role for tumor necrosis

factor in vascular endothelial growth factor-induced vascular permeability. *Blood*, **97**, 1321-1329.

COAKLEY, W.T., HEWISON, L.A., TILLEY, D. (1985). Interfacial instability and the agglutination of erythrocytes by polylysine. *Eur. Biophys. J.*, **13**, 123-130.

COKOL, M., NAIR, R., ROST, B. (2000). Finding nuclear localization signals. *EMBO Reports*, **1**: 411-415.

COMERFORD, L.W., BICKSTON, S.J. (2004). Treatment of luminal and fistulizing Crohn's disease with infliximab. *Gastroenterol. Clin. North Am.*, **33**, 387-406.

CONNOR, J., HUANG, L. (1986). pH-sensitive immunoliposomes as an efficient and target-specific carrier for antitumor drugs. *Cancer Res.*, **46**, 3431-3435.

CORSI, K., CHELLAT, F., YAHIA, L'H., FERNANDES, J.C. (2003). Mesenchymal stem cells, MG63 and HEK293 transfection using chitosan-DNA nanoparticles. *Biomaterials*, **24**, 1255-1264.

COUSSENS, L. M., TINKLE, C. L., HANAHAN, D., WERB, Z. (2000). MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell*, **103**: 481-490.

COUVREUR, P., GRISLAIN, L., LENAERTS, V., BRASSEUR, F., GUIOT, P., BIERNACKI, A. (1986). Biodegradable polymeric nanoparticles as drug carrier for antitumor agents. *Polymeric nanoparticles and microspheres*. P. Guiot and P. Couvreur Eds. Boca Raton, Fla.: CRC Press, p. 27.

CREMER, I., VIEILLARD, V., DE MAEYER, E. (2000). Retrovirally mediated IFN-beta transduction of macrophages induces resistance to HIV, correlated with up-regulation of RANTES production and down-regulation of C-C chemokine receptor-5 expression. *J. Immunol.*, **164**, 1582-1587.

DARGEMONT, C (2002). Export nucléaire des protéines et homéostasie cellulaire. *Medecine/Sciences*, **18**, 1237-1244.

DE DUVE, C., DE BARSY, T., POOLE, B., TROUET, A., TULKENS, P., VAN HOOF, F. (1974). Commentary. Lysosomotropic agents. *Biochem. Pharmacol.*, **23**, 2495-2531.

DIBBERT, B., WEBER, M., NIKOLAIZIK, W.H., VOGT, P., SCHÖNI, M.H., BLASER, K., SIMON, H.-U. (1999). Cytokine-mediated Bax deficiency and consequent delayed neutrophil apoptosis: A general mechanism to accumulate effector cells in inflammation, *PNAS*, **96**, 13330-13335.

DINGWALL, C., LASKEY, R.A. (1991). Nuclear targeting sequences--a consensus? *Trends Biochem. Sci.*, **16**:478-481.

DOWTY, M.E., WILLIAMS, P., ZHANG, G., HAGSTROM, J.E., WOLFF, J.A. (1995). Plasmid DNA entry into postmitotic nuclei of primary rat myotubes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **92**:4572-4576.

DUNLAP, D.D., MAGGI, A., SORIA, M.R., MONACO, L. (1997). Nanoscopic structure of DNA condensed for gene delivery. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3095-3101.

DUZGUNES, N., PRETZER, E., SIMOES, S., SLEPUSHKIN, V., KONOPKA, K., FLASHER, D., DE LIMA, M.C. (1999). Liposome-mediated delivery of antiviral agents to human immunodeficiency virus-infected cells. *Mol. Membr. Biol.* **16**, 111-118.

ELLIOTT, G., O'HARE, P. (1997). Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell*, **88**, 223-233.

ELLIS, J., BERNSTEIN, A. (1989). Gene targeting with retroviral vectors: recombination by gene conversion into regions of nonhomology, *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 1621-1627.

ELOUAHABI, A., RUYSSCHAERT, J.M. (2005). Formation and intracellular trafficking of lipoplexes and polyplexes. *Mol. Ther.*, **11**, 336-347.

ERBACHER, P., BOUSSER, M.T., RAIMOND, J., MONSIGNY, M., MIDOUX, P., ROCHE, A.C. (1996). Gene transfer by DNA/glycosylated polylysine complexes into human blood monocyte-derived macrophages. *Hum Gene Ther.*, **7**, 721-729.

FELDMAN, L.J., ISNER, J.M. (1995). Gene therapy for the vulnerable plaque. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **26**, 826-835.

FELGNER, J.H., KUMAR, R., SRIDHAR, C.N., WHEELER, C.J, TSAI, Y.J., BORDER, R., RAMSEY, P., MARTIN, M., FELGNER, P.L. (1994). Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations, *J. Biol. Chem.*, **269**, 2550-2561.

FELGNER, P.L., GADEK, T.R., HOLM, M., ROMAN, R., CHAN, H.W., WENZ, M., NORTHROP, J.P., RINGOLD, G.M., DANIELSEN, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 7413-7417.

FELLOWES, R., ETHERIDGE, C. J., COADE, S., COOPER, R.G., STEWART, L., MILLER, A.D., WOO, P. (2000). Amelioration of established collagen induced arthritis by systemic IL-10 gene delivery. *Gene Ther.*, **7**, 967-977.

FENSKE, D.B., MACLACHLAN, I., CULLIS, P.R. (2002). Stabilized plasmid-lipid particles: a systemic gene therapy vector. *Methods Enzymol.*, **346**, 36-71.

FERKOL, T., PERALES, J.C., ECKMAN, E., KAETZEL, C.S., HANSON, R.W., DAVIS, P.B. (1995). Gene transfer into the airway epithelium of animals by targeting the polymeric immunoglobulin receptor. *J. Clin. Invest.*, **95**, 493-502.

FINK, D.J., GLORIOSO, J.C. (1997). Herpes simplex virus-based vectors: problems and some solutions. *Adv. Neurol.*, **72**, 149-156.

FINK, D.J., RAMAKRISHNAN, R., MARCONI, P., GOINS, W.F., HOLLAND, T.C., GLORIOSO, J.C. (1995). Advances in the development of herpes simplex virus-based gene transfer vectors for the nervous system. *Clin. Neurosci.*, **3**, 284-291.

FISCHER, D., BIEBER, T., LI, Y., ELSASSER, H.-P., KISSEL, T. (1999). A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and toxicity. *Pharm. Res.*, **16**, 1273-1279.

FLOTTE, T.R., LAUBE, B.L. (2001). Gene therapy in cystic fibrosis. *Chest.*, **120**, 124S-131S.

FRANKEL, A.D., PABO, C.O. (1988). Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*, **55**, 1189-1193.

FRASER, A., FEARON, U., REECE, R., EMERY, P., VEALE, D.J. (2001). Matrix metalloproteinase 9, apoptosis, and vascular morphology in early arthritis. *Arthritis Rheum.*, **9**, 2024-2028.

FREEMONT, A.J., HAMPSON, V., TILMAN, R., GOUPILLE, P., TAIWO, Y., HOYLAND, J.A. (1997). Gene expression of matrix metalloproteinases 1, 3, and 9 by chondrocytes in osteoarthritic human knee articular cartilage is zone and grade specific. *Ann. Rheum. Dis.*, **56**, 542-549.

FUNATO, K., BERON, W., YANG, C.Z., MUKHOPADHYAY, A., STAHL, P.D. (1997). Reconstitution of phagosome-lysosome fusion in streptolysin O-permeabilized cells. *J Biol Chem*, **272**, 16147-16151.

GARNETT, M.C. (1999). Gene-delivery systems using cationic polymers. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **16**, 147-207.

GEYER, R.P. (1967). Studies on the mechanism of intravenous fat emulsions. *Fette Med.*, **6**, 59-61.

GIPPS, E.M., GROSCURTH, P., KREUTER, J., SPEISER, P.P. (1987). The effects of polyalkylcyanoacrylate nanoparticles on human normal and malignant mesenchymal cells in vitro. *Int. J. Pharm.*, **40**, 23-31.

GLOVER, D.J., LIPPS, H.J., JANS, D.A. (2005). Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans. *Nat. Rev. Genet.*, **6**, 299-310.

GODBEY, W.T., WU, K.K., MIKOS, A.G. (1999). Size matters: molecular weight affects the efficiency of poly(ethylenimine) as a gene delivery vehicle, *J. Biomed Mat. Res.*, **45**, 268-275.

GODBEY, W.T., WU, K.K., MIKOS, A.G. (1999). Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine) /DNA complexes for gene delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **96**, 5177-5181.

GOSULE, L.C., SCHELLMAN, J.A. (1978). DNA condensation with polyamines I. Spectroscopic studies. *J Mol Biol.*, **121**, 311-126.

GOTTSCHALK, S, SPARROW, J.T., HAUER, J., MIMS, M.P., LELAND, F.E., WOO, S.L., SMITH, L.C. (1996). A novel DNA-peptide complex for efficient gene transfer and expression in mammalian cells. *Gene Ther.*, **3**, 48-57.

GOTTSCHALK, S., CRISTIANO, R.J., SMITH, L.C., WOO, S.L. (1994). Folate receptor mediated DNA delivery into tumor cells: potosomal disruption results in enhanced gene expression. *Gene Ther.*, **1**, 185-191.

GRAHAM, F.L., PREVEC, L. (1995). Methods for construction of adenovirus vectors. *Mol. Biotechnol.*, **3**, 207-220.

GRAHAM, F.L., VAN DEREB, A.J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*, **52**, 456-467.

GREEN, A.M., Steinmetz, N.D. (2002). Monitoring apoptosis in real time. *Cancer J.*, **8**, 82-92.

GUERRIER-TAKADA, C., GARDINER, K., MARSH, T., PACE, N., ALTMAN, S. (1983). The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell*, **35**, 849-857.

GUISE, V., JAFFRAY, P., DELATTRE, J., PUISIEUX, F., ADOLPHE, M., COUVREUR, P. (1987). Comparative cell uptake of propidium iodide associated with liposomes or nanoparticles. *Cell. Mol. Biol.*, **33**, 397-405.

HART, S.L., HARBOTTLE, R.P., COOPER, R., MILLER, A., WILLIAMSON, R., COUTELLE, C. (1995). Gene delivery and expression mediated by an integrin-binding peptide. *Gene Ther.*, **2**, 552-554.

HARVIE, P., WONG, F.M.P., BALLY, M.B. (1998). Characterization of lipid DNA interactions. I. Destabilization of bound lipids and DNA dissociation. *Biophys. J.*, **75**, 1040-1051.

HEGYI, L., HARDWICK, S.J., SIOW, R.C., SKEPPE, J.N. (2001). Macrophage death and the role of apoptosis in human atherosclerosis. *J. Hematother. Stem Cell Res.*, **10**, 27-42.

HOLLAND, J.J., MCLAREN, L.C., SYVERTON, J.T. (1959). The Mammalian cell-virus relationship. III. Poliovirus production by non-primate cells exposed to poliovirus ribonucleic acid. *Proc. Soci. Exp. Biol. Med.*, **100**, 843-845.

HOLTZMAN, E. (1989). Lysosomes. Plenum Press. New York, London. 439 pp.

HUANG, C. (1969). Studies on phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics. *Biochemistry*, **8**, 344-352.

HUCKETT, B., ARIATTI, M., HAWTREY, A.O. (1990). Evidence for targeted gene transfer by receptor-mediated endocytosis. Stable expression following insulin-directed entry of NEO into HepG2 cells. *Biochem Pharmacol*, **40**, 253-263.

ILLUM, L., JACOBSEN, L.O., MULLER, R.H., MAK, E., DAVIS, S.S. (1987). Surface characteristics and the interaction of colloidal particles with mouse peritoneal macrophages. *Biomaterials*, **8**, 113-117.

INUZUKA, K., OGATA, Y., NAGASE, H., SHIROUZU, K. (2000). Significance of coexpression of urokinase-type plasminogen activator, and matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) and 9 (gelatinase B) in colorectal carcinoma. *J. Surg. Res.*, **93**, 211-218.

JAIN, A., NANCHAHAL, J., TROEBERG, L., GREEN, P., BRENNAN, F. (2001). Production of cytokines, vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinases, and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 by tenosynovium demonstrates its potential for tendon destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, **44**, 1754-1760.

JEPSSON, R., ROSSNER, S. (1975). The influence of emulsifying agents and of lipid soluble drugs on the fractional removal rate of lipid emulsions from the blood stream of the rabbit. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*, **37**, 134-144.

JOLIOT, A., PERNELLE, C., DEAGOSTINI-BAZIN, H., PROCHIANTZ, A. (1991). Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 1864-1868.

JOVANOVIC, D.V., MARTEL-PELLETIER, J., DI BATTISTA, J.A., MINEAU, F., JOLICOEUR, F.C., BENDERDOUR, M., PELLETIER, J.P. (2000). Stimulation of 92-kd gelatinase (matrix metalloproteinase 9) production by interleukin-17 in human monocyte/macrophages: a possible role in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, **43**, 1134-1144.

- JOYNER, A., KELLER, G., PHILLIPS, R.A., BERNSTEIN, A. (1983). Retrovirus transfer of a bacterial gene into mouse haematopoietic progenitor cells. *Nature*, **305**, 556-558.
- KABANOV, A.V., KABANOV, V.A. (1995). DNA complexes with polycations for the delivery of genetic material into cells. *Bioconjug. Chem.*, **6**, 7-20.
- KANG, E.C., AKIYOSHI, K., SUNAMOTO, J. (1997). Surface coating of liposomes with hydrophobized polysaccharides. *J. Bioact. Compat. Polym.*, **12**, 14-26.
- KANTE, B., COUVREUR, P., DUBOIS-KRACK, G., DE MEESTER, C., GUIOT, P., ROLAND, M., MERCIER, M., SPEISER, P. (1982). Toxicity of polyalkylcyanoacrylate nanoparticles I: Free nanoparticles. *J. Pharm. Sci.*, **71**, 786-790.
- KATO, T., OKADA, S., YUTAKA, T., YABUUCHI, H. (1984). The effects of sucrose loading on lysosomal hydrolases. *Mol. Cell Biochem.*, **60**, 83-98.
- KICHLER, A., LEBORGNE, C., COEYTAUX, E., DANOS, O. (2001). Polyethylenimine-mediated gene delivery: a mechanistic study. *J. Gene Med.*, **3**, 135-144.
- KINNE, R.W., BRAUER, R., STUHLMULLER, B., PALOMBO-KINNE, E., BURMESTER, G.R. (2000). Macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.*, **2**, 189-202.
- KIRCHEIS, R., SCHULLER, S., BRUNNER, S., OGRIS, M., HEIDER, K.H., ZAUNER, W., WAGNER, E. (1999). Polycation-based DNA complexes for tumor-targeted gene delivery in vivo. *J. Gene Med.*, **1**, 111-120.

KIRCHEIS, R., WIGHTMAN, L., KURSA, M., SMREKAR, B., OSTERMANN, E., WAGNER, E. (2001). Surface-shielded polycation-based systems targeting reporter and therapeutic genes to distant tumors. *Gene Ther. Mol. Biol.*, **6**, 159-167.

KISICH, K.O., MALONE, R.W., FELDSTEIN, P.A., ERICKSON, K.L. (1999). Specific inhibition of macrophage TNF- α expression by in vivo ribozyme treatment. *J. Immunol.* **163**, 2008-2016.

KISSELEVA, E., BECKER, M., LEMM, M., FICHTNER, I. (1996). Involvement of macrophages and cytokines into rejection mechanism of the drug-resistant and immunogenic murine lymphoma P388/adria. *Anticancer Res.*, **16**, 1971-1978.

KLIMIUK, P.A., YANG, H., GORONZY, J.J., WEYAND, C.M. (1999). Production of cytokines and metalloproteinases in rheumatoid synovitis is T cell dependent. *Clin. Immunol.*, **90**, 65-78.

KOLTOVER, I., SALDITT, T., RADLER, J.O., SAFINYA, C.R. (1998). An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery. *Science*, **281**, 78-81.

KONO, K., ZENITANI, K., TAKAGISHI, T. (1994). Novel pH-sensitive liposomes: liposomes bearing a poly(ethylene glycol) derivative with carboxyl groups. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1193**, 1-9.

KORNFELD, S., MELLMAN, I. (1989). The biogenesis of lysosomes. *Annu Rev Cell Biol.* **5**, 483-525.

KOVESDI, I., BROUGH, D.E., BRUDER, J.T., WICKHAM, T.J. (1997). Adenoviral vectors for gene transfer. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **8**, 583-589.

KREISS, P., CAMERON, B., RANGARA, R., MAILHE, P., AGUERRE-CHARRIOL, O., AIRIAU, M., SCHERMAN, D., CROUZET, J., PITARD, B. (1999). Plasmid DNA size does not affect the physicochemical properties of lipoplexes but modulates gene transfer efficiency. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 3792-3798.

KREUTER, J., WILSON, C.G., FRY, J.R., PATERSON, P., RATCLIFFE, J.H. (1984). Toxicity and association of polycyanoacrylate nanoparticles with hepatocytes. *J. Microencapsul.*, **1**, 253-257.

KYRIAKIDES, T.R., CHEUNG, C.Y., MURTHY, N., BORNSTEIN, P., STAYTON, P.S., HOFFMAN, A.S. (2002). pH-sensitive polymers that enhance intracellular drug delivery in vivo. *J. Control. Release*, **78**, 295-303.

LAUKKANEN, J., LEHTOLAINEN, P., GOUGH, P.J., GREAVES, D.R., GORDON, S., YLA-HERTTUALA, S. (2000). Adenovirus-mediated gene transfer of a secreted form of human macrophage scavenger receptor inhibits modified low density lipoprotein degradation and foam-cell formation in macrophages. *Circulation*, **101**, 1091-1096.

LEACH, W.T., SIMPSON, D.T., VAL, T.N., ANUTA, E.C., YU, Z., WILLIAMS, R.O. 3rd, JOHNSTON, K.P. (2005). Uniform encapsulation of stable protein nanoparticles produced by spray freezing for the reduction of burst release. *J. Pharm. Sci.*, **94**, 56-69.

LEBER, T.M., BALKWILL, F.R. (1998). Regulation of monocyte MMP-9 production by TNF-alpha and a tumour-derived soluble factor (MMPSF). *Br. J. Cancer*, **78**, 724-732.

LECHARDEUR D., SOHN K-J., HAARDT M., JOSHI PB., MONCK M., GRAHAM RW., BEATTY B., SQUIRE J., O'BRODOVICH H. AND LUKACS GL. Metabolic

instability of plasmid DNA in the cytosol: A potential barrier to gene transfer. *Gene Ther.*; **6**:482-497 (1999).

LEE, H., JEONG, J.H., PARK, T.G. (2002). PEG grafted polylysine with fusogenic peptide for gene delivery: high transfection efficiency with low cytotoxicity. *J. Control. Release*, **79**, 283-291.

LEGENDRE, J.Y., SZOKA, F.C. JR. (1992). Delivery of plasmid DNA into mammalian cell lines using pH-sensitive liposomes: comparison with cationic liposomes. *Pharm. Res.*, **9**, 1235-1242.

LENAERTS, V., NAGELKERKE, J.F., VAN BERKEL, T.J., COUVREUR, P., GRISLAIN, L., ROLAND, M., SPEISER, P. (1984). *In vivo* uptake of polyisobutyl cyanoacrylate nanoparticles by rat liver Kupffer, endothelial, and parenchymal cells. *J. Pharm. Sci.*, **73**, 980-982.

LEVY, L., MEYAR, K.B., BARRON, L., SZOKA, F.C. (1994). Mechanism of gene uptake and expression in adult mouse skeletal muscle. *Pharm. Res.*, **11**, 317-321.

LHERM, C., MÜLLER, R.H., PUISIEUX, F., COUVREUR, P. (1992). Alkylcyanoacrylate drug carriers. II. Cytotoxicity of nanoparticles with different alkyl chain length. *Int. J. Pharm.*, **84**, 13-22.

LI, S., HUANG, L. (2000). Nonviral gene therapy: promises and challenges. *Gene Ther.*, **7**, 31-34.

LIANG, M.R., ALESTROM, P., COLLAS, P. (2000). Glowing zebrafish: integration, transmission, and expression of a single luciferase transgene promoted by noncovalent DNA-nuclear transport peptide complexes. *Mol. Reprod. Dev.*, **55**, 8-13.

LIM, Y., KIM, C., KIM, K., KIM, S.W., PARK, J. (2000). Development of a safe gene delivery system using biodegradable polymer, poly[α -(4-aminobutyl)-L-glycolic acid]. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 6524-6525.

LORIES R. J.U., DERESE I., CEUPPENS J.L., LUYTEN F.P. Bone morphogenetic proteins 2 and 6, expressed in arthritic synovium, are regulated by proinflammatory cytokines and differentially modulate fibroblast-like synoviocyte apoptosis. *Arthritis Rheum.* 2003; 48:2807-2818.

LOT, T.Y. (1992). The effects of peripherally administered chloroquine on body temperature *in vivo*. **6**, 239-243.

LUDTKE, J.J., ZHANG, G., SEBESTYEN, M.G., WOLFF, J.A. (1999). A nuclear localization signal can enhance both the nuclear transport and expression of 1 kb DNA. *J Cell Sci.*, **112**, 2033-2041.

LUKACS, G.L., HAGGIE, P., SEKSEK, O., LECHARDEUR, D., FREEDMAN, N., VERKMAN, A.S. (2000). Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus. *J. Biol. Chem.*, **275**, 1625-1629.

LUO, D., SALTZMAN, W.M. (2000). Synthetic DNA delivery systems. *Nature biotechnology*, **18**, 33-37.

LUTHMAN, H., MAGNUSSON, G. (1983). High efficiency polyoma DNA transfection of chloroquine treated cells. *Nucleic Acids Res.*, **11**, 1295-1308.

LYNN, D.M., LANGER, R. (2000). Degradable poly(b-amino ester): synthesis, characterization, and self-assembly with plasmid DNA. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 10761-10768.

MAEDA, M., KUMANO, A., TIRRELL, D.A. (1988). H⁺-induced release of contents of phosphatidylcholine vesicles bearing surface-bound polyelectrolyte chains. *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 7455-7459.

MAINI, R., ST CLAIR, E.W., BREEDVELD, F., FURST, D., KALDEN, J., WEISMAN, M. SMOLEN, J., EMERY, P., HARRIMAN, G., FELDMANN, M., LIPSKY, P. (1999). Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomised phase III trial. ATTRACT Study Group. *Lancet*, **354**, 1932-1939.

MANN, D.A., FRANKEL, A.D. (1991). Endocytosis and targeting of exogenous HIV-1 Tat protein. *EMBO J.*, **10**, 1733-1739.

MARTIGNETTI, J.A., AQEEL, A.A., SEWAIRI, W.A., BOUMAH, C.E., KAMBOURIS, M., MAYOUF, S.A., SHETH, K.V., EID, W.A., DOWLING, O., HARRIS, J., GLUCKSMAN, M.J., BAHABRI, S., MEYER, B.F., DESNICK, R.J. (2001). Mutation of the matrix metalloproteinase 2 gene (MMP2) causes a multicentric osteolysis and arthritis syndrome. *Nat. Genet.*, **28**, 261-265.

MATSUOKA, Y., TAKAGI, M., BAN, T., MIYAZAKI, M., YAMAMOTO, T., KONDO, Y., YONEDA, Y. (1999). Identification and characterization of nuclear pore subcomplexes in mitotic extract of human somatic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **254**, 417-423.

MATTAJ, I.W., ENGLMEIER, L. (1998). Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 265-306.

MAURER N., MORI A., PALMER L., MONCK M.A., MOK K.W., MUI B., AKHONG Q.F., CULLIS P.R. (1999). Lipid-based systems for the intracellular delivery of genetic drugs. *Mol. Membr. Biol.*, **16**:129-140.

MAUTINO G, HENRIQUET C, GOUGAT C, LE CAM A, DAYER J-M, BOUSQUET J, CAPONY F. (1999). Increased Expression of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 and Loss of correlation with Matrix Metalloproteinase-9 by Macrophages in Asthma. *Lab. Invest.*, **79**, 39-47.

MAUTINO, G., OLIVER, N., CHANEZ, P., BOUSQUET, J., CAPONY, F. (1997). Increased release of matrix metalloproteinase-9 in bronchoalveolar lavage fluid and by alveolar macrophages of asthmatics. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **17**, 583-591.

MERDAN, T., KOPECEK, J., KISSEL, T. (2002). Prospects of cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **54**, 715-758.

MERDAN, T., KUNATH, K., FISCHER, D., KOPECEK, J., KISSEL, T. (2002). Intracellular processing of poly(ethylene imine)/ribozyme complexes can be observed in living cells by using confocal laser scanning microscopy and inhibitor experiments. *Pharm. Res.*, **19**, 140-146.

MERI, S., PANGBURN, M.K. (1994). Regulation of alternative pathway complement activation by glycosaminoglycans: specificity of the polyanion binding site on factor H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **198**, 52-59.

MEYER, O., PAPAHAADJOPOULOS, D., LEROUX, J.C. (1998). Copolymers of N-isopropylacrylamide can trigger pH sensitivity to stable liposomes. *FEBS Lett.*, **421**, 61-64.

MILLER, A.D. (1992). Retroviral vectors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **158**: 1-24 b.

MOGHIMI, S.M., HUNTER, A.C. (2000). Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine. *Trends Biotechnol.*, **18**, 412-420.

MOGHIMI, S.M., MUIR, I.S., ILLUM, L., DAVIS S.S., KOLB-BACHOFEN, V. (1993). Coating particles with a block co-polymer (poloxamine-908) suppresses opsonization but permits the activity of dysopsonins in the serum. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1179**:157-165.

MOGHIMI, S.M., SZE BENI, J. (2003). Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Prog. Lipid Res.*, **42**, 463-478.

MONCK, M.A., MORI, A., LEE, D., TAM, P., WHEELER, J.J., CULLIS, P.R., SCHERRER P. (2000). Stabilized plasmid-lipid particles: pharmacokinetics and plasmid delivery to distal tumors following intravenous injection. *J. Drug Target.*, **7**, 439-452.

MONFARDINI, C., VERONESE, F.M. (1998). Stabilization of substances in circulation. *Bioconjug. Chem.*, **9**, 418-450.

MOREAU, E., DOMURADO, M., CHAPON, P., VERT, M., DOMURAD, D. (2002). Biocompatibility of polycations: in vitro agglutination and lysis of red blood cells and in vivo toxicity. *J. Drug Target.*, **10**, 161-173.

MOSMANN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, **65**, 55-63.

MULLIGAN, R.C., HOWARD, B.H., BERG, P. (1979). Synthesis of rabbit beta-globin in cultured monkey kidney cells following infection with a SV40 beta-globin recombinant genome. *Nature*, **277**, 108-114.

MUNIER, S., MESSAI, I., DELAIR, T., VERRIER, B., ATAMAN-ONAL, Y. (2005). Cationic PLA nanoparticles for DNA delivery: comparison of three surface polycations for DNA binding, protection and transfection properties. *Colloids Surf. B : Biointerfaces*. **43**, 163-173.

MUNNIKSMA, J., NOTEBORN, M., KOOISTRA, T., STIENSTRA, S., BOUMA, J.M., GRUBER, M., BROUWER, A., PRAANING-VAN DALEN, D., KNOOK, D.L. (1980). Fluid endocytosis by rat liver and spleen. Experiments with ¹²⁵I-labelled poly(vinylpyrrolidone) in vivo. *Biochem. J.*, **192**, 613-621.

NAGASAKI, T., KAWAZU, T., TACHIBANA, T., TAMAGAKI, S., SHINKAI, S. (2005). Enhanced nuclear import and transfection efficiency of plasmid DNA using streptavidin-fused importin-beta. *J. Control. Release*, **103**, 199-207.

NALDINI, L., BLOMER, U., GAGE, F.H., TRONO, D., VERMA, I.M. (1996a). Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 11382-11388.

NALDINI, L., BLOMER, U., GALLAY, P., ORY, D., MULLIGAN, R., GAGE, F.H., VERMA, I.M. AND TRONO, D. (1996b). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*, **272**, 263-267.

NISHIHARA, K., BARTH, R.F., WILKIE, N., LANG, J.C., ODA, Y., KIKUCHI, H., EVERSON, M.P., LOTZE, M.T. (1995). Increased in vitro and in vivo tumoricidal activity of a macrophage cell line genetically engineered to express IFN-gamma, IL-4, IL-6, or TNF-alpha. *Cancer Gene Ther.* **2**,113-124.

NISHIKAWA, M., YAMAUCHI, M., MORIMOTO, K., ISHIDA, E., TAKAKURA, Y., HASHIDA, M. (2000). Hepatocyte-targeted in vivo gene expression by intravenous injection of plasmid DNA complexed with synthetic multi-functional gene delivery system. *Gene Ther.*, **7**, 548-555.

NOGUCHI, A., FURUNO, T., KAWAURA, C., NAKANISHI, M. (1998). Membrane fusion plays an important role in gene transfection mediated by cationic liposomes, *FEBS Lett.*, **433**, 169-173.

OGRIS, M., BRUNNER, S., SCHULLER, S., KIRCHEIS, R., WAGNER, E. (1999). PEGylated DNA/ transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery, *Gene Ther.*, **6**, 595-605.

OUPICKY, D., KONAK, C., ULBRICH, K., WOLFERT, M.A., SEYMOUR, L.W. (2000). DNA delivery systems based on complexes of DNA with synthetic polycations and their copolymers. *J. Control. Release.* **65**, 149-171.

OVERALL, C.M. (2001). Matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules and exosites. Overview and experimental strategies. *Methods Mol. Biol.*, **151**, 79-120.

PAGE, R.L., BUTLER, S.P., SUBRAMANIAN, A., GWAZDAUSKAS, F.C., JOHNSON, J.L., VELANDER, W.H. (1995). Transgenesis in mice by cytoplasmic injection of polylysine/DNA mixtures. *Transgenic Res.*, **4**, 353-360.

PAIN, D., DAS, P.K., GHOSH, P.C., BACHHAWAT, B.K. (1984). Increased circulatory half-life of liposomes after conjugation with dextran. *J. Biosci.*, **6**, 811-816.

PAINE, P.L., MOORE, L.C., HOROWITZ, S.B. (1975). Nuclear envelope permeability. *Nature*, **254**, 109-114.

Patil, S.D., Rhodes, D.G., Burgess, D.J. (2005). DNA-based Therapeutics and DNA Delivery Systems: A Comprehensive Review. *AAPS J.*, **7**, E61-E71.

PAUL, S., BIZOUARNE, N., DOTT, K., RUET, L., DUFOUR, P., ACRES, R.B., KIENY, M.P. (2000). Redirected cellular cytotoxicity by infection of effector cells with a recombinant vaccinia virus encoding a tumorspecific monoclonal antibody. *Cancer Gene Ther.*, **7**, 615-623.

PAUL, S., SNARY, D., HOEBEKE, J., ALLEN, D., BALLOUL, J.M., BIZOUARNE, N., DOTT, K., GEIST, M., HILGERS, J., KIENY, M.P., BURCHELL, J., TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J., ACRES, R.B. (2000). Targeted macrophage cytotoxicity using a nonreplicative live vector expressing a tumor-specific single-chain variable region fragment. *Hum. Gene Ther.*, **11**, 1417-1428.

PEDROSO DE LIMA, M.C., SIMOES, S., PIRES, P., FANCA, H., DUZGUNES, N. (2001). Cationic lipid-DNA complexes in gene delivery: from biophysics to biological applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **47**, 277-294.

PEEL David. Virus Vectors and Gene Therapy. Problems, Promises and Prospects.
<http://www.tulane.edu/~dmsander/WWW/335/peel/peel1.html#intro>.

PERACCHIA, M.T., VAUTHIER, C., PASSIRANI, C., COUVREUR, P., LABARRE, D. (1997). Complement consumption by poly(ethylene glycol) in different conformations chemically coupled to poly(isobutyl 2-cyanoacrylate) nanoparticles. *Life Sci.*, **61**, 749-761.

PETERS, R. (1986). Fluorescence microphotolysis to measure nucleocytoplasmic transport and intracellular mobility. *Biochim. Biophys. Acta*, **864**, 305-359.

PIGUET, P.F., GRAU, G.E., VESIN, C., LOETSCHER, H., GENTZ, R., LESSLAUER, W. (1992). Evolution of collagen arthritis in mice is arrested by treatment with anti-tumour necrosis factor (TNF) antibody or a recombinant soluble TNF receptor. *Immunology*, **77**, 510-504.

PLANK, C., MECHTLER, K., SZOKA, F.C. JR, WAGNER, E. (1996). Activation of the complement system by synthetic DNA complexes: a potential barrier for intravenous gene delivery. *Hum. Gene Ther.*, **7**, 1437-1446.

PLANK, C., OBERHAUSER, B., MECHTLER, K., KOCH, C., WAGNER, E. (1994). The influence of endosome-disruptive peptides on gene transfer using synthetic virus-like gene transfer systems. *J. Biol. Chem.*, **269**, 12918-12924.

RABINOVICH, G.A. (2000). Apoptosis as a target for gene therapy in rheumatoid arthritis. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.*, **95**, 225-233.

RAM, S., SHARMA, A.K., SIMPSON, S.D., GULATI, S., MCQUILLEN, D.P., PANGBURN, M.K., RICE, P.A. (1998). A novel sialic acid binding site on factor H

mediates serum resistance of sialylated *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Exp. Med.*, **187**, 743-752.

RAMSAY, E., HADGRAFT, J., BIRCHALL, J., GUMBLETON, M. (2000). Examination of the biophysical interaction between plasmid DNA and the polycations, polylysine and polyornithine, as a basis for their differential gene transfection in-vitro. *Int. J. Pharm.* **210**, 97-107.

RAPER SE, CHIRMULE N, LEE FS, WIVEL, N.A., BAGG, A., GAO, G.P., WILSON, J.M., BATSHAW, M.L. (2003). Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol. Genet. Metab.*, **80**, 148-158.

REITTER, J.N., MEANS, R.E., DESROSIERS, R.C. (1998). A role for carbohydrates in immune evasion in AIDS. *Nat Med.*, **4**, 679-684.

RIHS, H.P., JANS, D.A., FAN, H., PETERS, R. (1991). The rate of nuclear cytoplasmic protein transport is determined by the casein kinase II site flanking the nuclear localization sequence of the SV40 T-antigen. *EMBO J.*, **10**, 633-639.

RINGENBACH, L., BOHBOT, A., TIBERGHIE, P., OBERLING, F., FEUGEAS, O. (1998). Polyethylenimine-mediated transfection of human monocytes with the IFN-gamma gene: an approach for cancer adoptive immunotherapy. *Gene Ther.*, **5**, 1508-1516.

ROBINSON, S.C., SCOTT, K.A., BALKWILL, F.R. (2002). Chemokine stimulation of monocyte matrix metalloproteinase-9 requires endogenous TNF- α . *Eur. J. Immunol.*, **32**, 404-412.

ROSENKRANZ, A.A., YACHMENEV S.V., JANS, D.A., SEREBRYAKOVA, N.V., MURAV'EV, V.I., PETERS, R., SOBOLEV, A.S. (1992). Receptor-mediated endocytosis and nuclear transport of a transfecting DNA construct. *Exp. Cell Res.*, **199**, 323-329.

ROSS, G.F., MORRIS, R.E., CIRAOLO, G., HUELSMAN, K., BRUNO, M., WHITSETT, J.A., BAATZ, J.E., KORFHAGEN, T.R. (1995). Surfactant protein A-polylysine conjugates for delivery of DNA to airway cells in culture. *Hum. Gene Ther.*, **6**, 31-40.

RUDOLPH, C., PLANK, C., ROSENECKER, J. (2000). A novel peptide vector for gene transfer based on the arginine-rich motif of the HIV-1 TAT protein. *Pediatr. Pneumol.* **20**, 233-238.

SAITO, K., TAKEHA, S., SHIIBA, K., MATSUNO, S., SORSA, T., NAGURA, H. OHTANI, H. (2000). Clinicopathologic significance of urokinase receptor- and MMP-9-positive stromal cells in humancolorectal cancer: functional multiplicity of matrix degradation on hematogenous metastasis. *Int. J. Cancer.* **86**, 24-29.

SALMAN, H., ZBAIDA, D., RABIN, Y., CHATENAY, D., ELBAUM, M. (2001). Kinetics and mechanism of DNA uptake into the cell nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **98**, 7247-7252.

SAMULSKI, R.J. (1993). Adeno-associated virus: integration at a specific chromosomal locus. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **3**, 74-80.

SCHMID, I., UITTENBOGAART, C.H., KELD, B., GIORGI, J.V. (1994). A rapid method for measuring apoptosis and dual-color immunofluorescence by single laser flow cytometry, *J. Immunol. Methods*, **170**, 145-157.

SCHMIDT, R.J., CHUNG, L.Y., ANDREWS, A.M., SPYRATOU, O., TURNER, T.D. (1993). Biocompatibility of wound management products: a study of the effects of various polysaccharides on murine L929 fibroblast proliferation and macrophage respiratory burst. *J. Pharm. Pharmacol.*, **45**, 508-513.

SCHNEIDER, H., HUSE, K., BIRKENMEIER, G., OTTO, A., SCHOLZ, G.H. (1996). Gene transfer mediated by alpha2-macroglobulin. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 3873-3874.

SCHOLER, N., HAHN, H., MULLER, R.H., LIESENFELD, O. (2002). Effect of lipid matrix and size of solid lipid nanoparticles (SLN) on the viability and cytokine production of macrophages. *Int. J. Pharm.*, **231**, 167-176.

SCHWARZENBERGER, P., SPENCE, S.E., GOOYA, J.M., MICHIEL, D., CURIEL, D.T., RUSCETTI, F.W., KELLER, J.R. (1996). Targeted gene transfer to human hematopoietic progenitor cell lines through the c-kit receptor. *Blood*, **87**, 472-478.

SIMÕES, S., SLEPUSHKIN, V., GASPAR, R., PEDROSO DE LIMA, M.C., DUZGUNES, N. (1999). Mechanisms of gene transfer mediated by lipoplexes associated with targeting ligands and pH-sensitive peptides. *Gene Ther.*, **6**, 1798-1807.

SMAGLIK, P. (1999). Tighter watch urged on adenoviral vectors with proposal to report all 'adverse events'. *Nature*, 402, 707.

SMITH A.E. (1995). Viral vectors in gene therapy. *Annu. Rev. Microbiol.*, **49**, 807-838.

SMULL, C.E., LUDWIG, E.H. (1962). Enhancement of the plaque-forming capacity of poliovirus ribonucleic acid with basic proteins. *J. Bacteriol.*, **84**, 1035-1040.

SPEISER, D. E., OHASHI, P. S. (1998). Activation of cytotoxic T cells by solid tumours? *Cell Mol. Life Sci.*, **54**, 263-271.

SPIESS, M. (1990). The asialoglycoprotein receptor: a model for endocytic transport receptors. *Biochemistry*, **29**, 10009-10018.

STAMP, D., JULIANO, R.L. (1975). The effect of particle size and charge on the clearance rates of liposomes and liposome encapsulated drugs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **63**:651-658.

STOLNIK, S., DUNN, S.E., GARNETT, M.C., DAVIES, M.C., COOMBES, A.G., TAYLOR, D.C., IRVING, M.P., PURKISS, S.C., TADROS, T.F., DAVIS, S.S., ILLUM, L. (1994). Surface modification of poly(lactide-co-glycolide) nanospheres by biodegradable poly(lactide)-poly(ethylene glycol) copolymers. *Pharm. Res.*, **11**, 1800-1808.

STOSSEL, T.P., MASON, R.J., HARTWIG, J., VAUGHAN, M. (1972). Quantitative studies of phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes: use of emulsions to measure the initial rate of phagocytosis. *J. Clin. Invest.*, **51**, 615-624.

SUH, F., HOWARD, J.K., MATHEW, W.T. (2000). Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials*, **21**, 2589-2598.

TABATA, Y., IKADA, Y. (1988). Effect of the size and surface charge of polymer microspheres on their phagocytosis by macrophage. *Biomaterials*, **9**, 356-662.

TAHARA, H., LOTZE, M.T. (1995). Antitumor effects of interleukin-12 (IL-12): applications for the immunotherapy and gene therapy of cancer. *Gene Ther.*, **2**, 96-106.

TALCOTT, B., MOORE, M.S. (1999). Getting across the nuclear pore complex. *Trends Cell. Biol.*, **9**, 312-318.

TANG, M.X., SZOKA, F.C. (1997). The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes. *Gene Ther.*, **4**, 823-832.

THOMAS, J.L., TIRRELL, D.A. (1992). Polyelectrolyte-sensitized phospholipid vesicles. *Acc. Chem. Res.*, **25**, 336-342.

THURNHER, M., WAGNER, E., CLAUSEN, H., MECHTLER, K., RUSCONI, S., DINTER, A., BIRNSTIEL, M.L., BERGER, E.G., COTTON, M. (1994). Carbohydrate receptor-mediated gene transfer to human T leukaemic cells. *Glycobiology*, **4**, 429-435.

TORCHILIN, V.P., RAMMOHAN, R., WEISSIG, V., LEVCHENKO, T.S. (2001). TAT peptide on the surface of liposomes affords their efficient intracellular delivery even at low temperature and in the presence of metabolic inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 8786-8791.

TROSTER, S.D., MÜLLER, E., KREUTER, J. (1990). Modification of the body distribution of poly(methyl methacrylate) nanoparticles in rats by coating with surfactants. *Int. J. Pharm.*, **61**, 85-100.

TRUBETSKOY, V.S., TORCHILIN V.P., KENNEL, S.J., HUANG, L. (1992). Use of N-terminal modified poly(L-lysine)-antibody conjugate as a carrier for targeted gene delivery in mouse lung endothelial cells. *Bioconjug. Chem.*, **3**, 323-327.

TSCHOEP, K., HARTMANN, G., JOX, R., THOMPSON, S., EIGLER, A., KRUG, A., ERHARDT, S., ADAMS, G., ENDRES S., DELIUS, M. (2001). Shock waves: a novel method for cytoplasmic delivery of antisense oligonucleotides, *J. Mol. Med.*, **79**, 306-313.

TSENG, W.C., HASELTON, F.R., GIORGIO, T.D. (1997). Transfection by cationic liposomes using simultaneous single cell measurements of plasmid delivery and transgene expression. *J Biol Chem.*, **272**, 25641-25647.

TUNG, C., MUELLER, S., WEISSLEDER, R. (2002). Novel branching membrane translocational Peptide as gene delivery vector. *Bioorg. Med. Chem.*, **10**, 3609- 3614.

VAHERI, A., PAGANO, J.S. (1965). Infectious poliovirus RNA: a sensitive method of assay. *Virology*, **27**, 434-436.

VASU, S.K., FORBES, D.J. (2001). Nuclear pores and nuclear assembly. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **13**, 363-375.

WAGNER E., ZENKE, M., COTTEN, M., BEUG, H., BIRNSTIEL, M.L. (1990). Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 3410-3414.

WAGNER, E., COTTON, M., FOISNER, R., BIRNSTIEL, M.L. (1991). Transferrin-polycation-DNA complexes: the effect of polycations on the structure of the complex and DNA delivery to cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**, 4255-4259.

WAGNER, E., ZATLOUKAL, K., COTTON, M., KIRLAPPOS, H., MECHTLER, K., CURIEL, D.T., BIRNSTIEL, M.L. (1992). Coupling of adenovirus to transferrin-

polylysine/DNA complexes greatly enhances receptor-mediated gene delivery and expression of transfected genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **89**, 6099-6103.

WANG, Q., CAO, X., WANG, J., ZHANG, W., TAO, Q., YE, T. (2000). Macrophage activation of lymphoma-bearing mice by liposome-mediated intraperitoneal IL-2 and IL-6 gene therapy. *Chin. Med. J.*, **113**, 281-285.

WEBSTER, C., BLAU, H.M. (1990). Accelerated age-related decline in replicative life-span of Duchenne muscular dystrophy myoblasts: implications for cell and gene therapy. *Somat. Cell Mol. Genet.*, **16**, 557-565.

WEIS, K. (1998). Importins and exportins: how to get in and out of the nucleus. *Trends Biochem Sci.*, **23**, 185-189.

WILDENTHAL, K., DEES, J.H., BUJA, L.M. (1977). Cardiac lysosomal derangements in mouse heart after long-term exposure to nonmetabolizable sugars. *Circ Res.*, **40**, 26-35.

WILKINS, D.J., MYERS, P.A. (1966). Studies on the relationship between the electrophoretic properties of colloids and their blood clearance and organ distribution in the rat. *Br. J. Exp. Pathol.*, **47**, 568-576.

WOLFERT, M.A., SCHACHT, E.H., TONCHEVA, V., ULBRICH, K., NAZAROVA, O., SEYMOUR, L.W. (1996). Characterization of vectors for gene therapy formed by self-assembly of DNA with synthetic block co-polymers. *Hum. Gene Ther.* **7**, 2123-2133.

WOLFERT, M.A., SEYMOUR, L.W. (1996). Atomic force microscopic analysis of the influence of the molecular weight of poly(L)lysine on the size of polyelectrolyte complexes formed with DNA. *Gene Ther.*, **3**, 269-273.

WOLFF, J.A., MALONE R.W., WILLIAMS P., CHONG W., ACSADI G., JANI A., FELGNER P.L. (1990). Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*, **247**, 1465-1468.

WU, C.H., WILSON, J.M., WU, G.Y. (1989). Targeting genes: delivery and persistent expression of a foreign gene driven by mammalian regulatory elements in vivo. *J. Biol. Chem.*, **264**, 16985-16987.

WU, G.Y., WU, C.H. (1988). Receptor-mediated gene delivery and expression in vivo. *J. Biol. Chem.*, **263**, 14621-14624.

YIN, W., CHENG, P.W. (1994). Lectin conjugate-directed gene transfer to airway epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **205**, 826-833.

ZANTA, M.A., BELGUISE-VALLADIER, P., BEHR, J.P. (1999). Gene delivery: a single nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **96**, 91-96.

ZIGNANI, M., DRUMMOND, D.C., MEYER, O., HONG, K., LEROUX, J.C. (2000). In vitro characterization of a novel polymeric-based pH-sensitive liposome system. *Biochim Biophys Acta*, **1463**, 383-394.

ZUIDAM, N.J., BARENHOLZ, Y. (1998). Electrostatic and structural properties of complexes involving plasmid DNA and cationic lipids commonly used for gene delivery. *Biochim. Biophys. Acta*, **1368**, 115-128.